Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Citotoxicidad asociada al estrés oxidativo inducida por ipconazol en células endoteliales EA.hy926

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Junior Francisco SIGUAS PEÑA

ASESOR

Dr. Luis Manuel BARRIOS ARPI

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Siguas J. Citotoxicidad asociada al estrés oxidativo inducida por ipconazol en células endoteliales EA.hy926 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2025.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Junior Francisco Siguas Peña
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70798064
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1490-3206
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Luis Manuel Barrios Arpi
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	43485699
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5166-4136
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25455526
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Jose Alfonso Apesteguia Infantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09359857
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Davis Alberto Mejia Pinedo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41490146

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.3.3 Toxicología experimental
Grupo de investigación	Fisiología y fisiopatología en animales de trópico y de altura -GIFATA
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de investigación con financiamiento para grupos de investigación año 2023. A23080521
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Abril 2023 – Diciembre 2023
URL de disciplinas OCDE	Toxicología **https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07**

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA

Siendo las **11:00 hrs. del 21 de abril de 2025** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Dr. Luis Manuel Barrios Arpi (asesor), Dr. José Alfonso Apesteguia Infantes y el Dr. Davis Alberto Mejia Pinedo; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"CITOTOXICIDAD ASOCIADA AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDA POR IPCONAZOL EN CÉLULAS ENDOTELIALES EA.HY926"**, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Junior Francisco Siguas Peña.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Toxicología.** Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

18 Dieciocho - MUY BUENO

Luego el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Junior Francisco Siguas Peña,** el Grado Académico de **Magíster en Toxicología.**

Siendo las 10:... hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 11:50 hrs. del 21 de abril del 2025.

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P. D.E)
Presidente

Dr. Luis Manuel Barrios Arpi (P.Asoc. D.E.)
Miembro - Asesor

Dr. José Alfonso Apesteguia Infantes (P. P. T.C.)
Miembro

Dr. Davis Alberto Mejia Pinedo (P. Aux T.P.)
Miembro

Observaciones:

.....

.....

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Luis Manuel Barrios Arpi, en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N° 00101/FFB-UPG/2023 de la tesis, cuyo título es: **CITOTOXICIDAD ASOCIADA AL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDA POR IPCONAZOL EN CÉLULAS ENDOTELIALES EA.HY926,** presentado por el Bach. **Junior Francisco Siguas Peña,** para optar al Grado Académico de Magister en Toxicología, CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el **13**% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Lima, 14 de abril de 2025

UNMSM Firmado digitalmente por BARRIOS ARPI Luis Manuel FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 14.04.2025 22:06:54 -05:00

Firma del Asesor _____

Dr. Luis Manuel Barrios Arpi

DNI: 43485699

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme sabiduria y fortaleza a lo largo de todo este tiempo para poder conseguir finalizar el presente trabajo de tesis.

A mis padres Luz Peña y Francisco Siguas, pilares importantes en mi vida por sus consejos y apoyo incondicional. En especial consideracion a mi querida madre por siempre formar parte de mis proyectos y siempre estar al lado desde el inicio y final de cada uno de ellos.

A Rosa Herrera Napa por que desde tuve razon de ser siempre me cuido y me guio en toda mi Carrera profesional. Querida abuela hoy más que nunca puedo decirte que seguimos avanzando sin tenerte a mi lado pero siempre en tu memoria.

A todos aquellos que me brindaron su confianza a nivel profesional y que formamos lazos de amistad.

Al Jurado Calificador:

Dr. QF. Américo Jorge Castro Luna (Presidente)

Dr. MV. Luis Manuel Barrios Alpi (Asesor)

Dr. QF. José Alfonso Apesteguía Infantes (Miembro)

Dr. QF. Davis Alberto Mejía Pinedo (Miembro)

Por los aportes a la presente Tesis.

Finalmente todo esto se pudo lograr gracias a ustedes.

DEDICATORIA

Al **Dr. Luis Manuel Barrios Arpi** por su valioso apoyo y acompañamiento a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

Al grupo de investigación en **Fisiología y Fisiopatología en Animales de Trópico y de Altura (GIFATA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM**, por su gran apoyo incondicional y guía a lo largo de la presente investigación.

Finalmente, a los docentes de la **Maestría en Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM** por su gran labor y acompañamiento, lo cual nos permitió culminar de manera exitosa, después de 2 años, el presente grado académico.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 1
1.1 **Objetivo general** 3
1.2 **Objetivos específicos** 3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 4
2.1. Antecedentes de la investigación 4
2.2. Bases teóricas 12
2.2.1. Triazoles 13
2.2.2. Triazoles toxicidad experimental 14
A. Propiconazol 14
B. Penconazol 15
C. Flusilazol 16
D. Tebuconazol 16
E. Ipconazol 17
2.2.3. Estrés oxidativo 19
2.2.4. Muerte celular 22
2.2.5. Complejo inflamasoma 25
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 30
3.1. Tipo de Investigación 30
3.2. Consideraciones éticas 30
3.3. Diseño metodológico 30
Materiales y métodos 30
A. Cultivo celular 30
B. Evaluación de la viabilidad celular (MTT) 31
C. Producción de ROS 31
D. Ensayo apoptótico con actividad Caspasa3/7 32
E. Ensayo de PCR en tiempo real 32
F. Materiales y reactivos 34
G. Equipos 36
3.5. Población de estudio 36
3.6. Muestra de estudio 37
3.7. Criterios de selección 37
3.7.1. Criterios de inclusión 37
3.7.2. Criterios de exclusión 37
3.8. Instrumento de recolección de datos 37
3.9. Procesamiento de los datos 37

CAPÍTULO IV. RESULTADOS **38**
CAPÍTULO V. DICUSIÓN **45**
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES **49**
CAPÍTULO VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS **50**

RESUMEN

Los fungicidas triazol son ampliamente utilizados en el mundo, principalmente en la agricultura, pero su abuso y posibles efectos tóxicos están siendo reportados en algunos estudios *in vivo* e *in vitro* que han demostrado su peligrosidad para la salud humana. Este estudio *in vitro* evaluó la citotoxicidad, el estrés oxidativo y la expresion de genes proinflamatorios de las células endoteliales EA.hy926 en respuesta a la exposición a ipconazol. Utilizando el ensayo MTT, se encontró que ipconazol produce una reducción dependiente de la dosis (*** $p < 0,001$; concentraciones de 20, 50 y 100 µM) de la viabilidad celular en celulas endoteliales EA.hy926 con una CI_{50} de 29 µM. Además, ipconazol indujo un aumento significativo en la generación de ROS (** $p < 0,01$), caspasa 3/7 (** $p < 0,01$),expresion de genes relacionados a muerte celular (*BAX, APAF1, BNIP3, CASP3 y AKT1*) y expresion de genes proinflamatorios (*NLRP3, CASP1, IL1β, NFκB, IL6 y TNFα*), así como una reducción de los biomarcadores antioxidantes (NRF2 y GPx). Estos resultados demostraron que el estrés oxidativo, la actividad proinflamatoria y la muerte celular podrían ser responsables del efecto citotóxico producido por el fungicida ipconazol, por lo que este compuesto triazol debe considerarse como un posible factor de riesgo en el desarrollo de alteraciones en la homeostasis celular.

Palabras clave: citotoxicidad, inflamasoma, estrés oxidativo, apoptosis, ipconazol

ABSTRACT

Triazole fungicides are widely used around the world, mainly in agriculture, but their misuse and potential toxic effects are being reported in some *in vivo* and *in vitro* studies that have demonstrated their dangers to human health. This *in vitro* study evaluated the cytotoxicity, oxidative stress, and expression of pro-inflammatory genes in EA.hy926 endothelial cells in response to ipconazole exposure. Using the MTT assay, it was found that ipconazole produces a dose-dependent reduction (* $p < 0.001$; concentrations of 20, 50, and 100 μM) in cell viability in EA.hy926 endothelial cells with an IC50 of 29 μM. Additionally, ipconazole induced a significant increase in ROS generation (** $p < 0.01$), caspase 3/7 (** $p < 0.01$), expression of cell death-related genes (BAX, APAF1, BNIP3, CASP3, and AKT1), and expression of pro-inflammatory genes (NLRP3, CASP1, IL1β, NFκB, IL6, and TNFα), as well as a reduction in antioxidant biomarkers (NRF2 and GPx). These results demonstrated that oxidative stress, pro-inflammatory activity, and cell death could be responsible for the cytotoxic effect produced by the fungicide ipconazole, thus indicating that this triazole compound should be considered a potential risk factor in the development of alterations in cellular homeostasis.

Keywords: cytoxicity, inflammasome, oxidative stress, apoptosis, ipconazole.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura química de fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol. **13**

Figura 2. Estructura química del fungicida Ipconazol. **18**

Figura 3. Vínculo entre ROS, estrés oxidativo y sus efectos en el cuerpo humano. **22**

Figura 4. Componentes principales de las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis. **25**

Figura 5. Los componentes del complejo inflamasoma. **26**

Figura 6. Mecanismos simplificados de cebado y activación del inflamasoma NLRP3. **29**

Figura 7. Reducción de la viabilidad celular producida por el fungicida ipconazol. **38**

Figura 8. Generación de ROS inducida por el fungicida ipconazol. **39**

Figura 9. Actividad enzimática de la caspasa3/7 por el fungicida ipconazole. **40**

Figura 10. Mapa de calor de la asociación entre biomarcadores con la muerte celular. **42**

Figura 11. Mapa de calor de la asociación entre biomarcadores con el complejo inflamasoma. **43**

Figura 12. Mapa de calor de la asociación entre biomarcadores antioxidantes. **44**

INDICE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de cebadores **33**
Tabla 2. Expresión génica de biomarcadores moleculares relacionados con la muerte celular. **41**
Tabla 2. Expresión génica de biomarcadores moleculares relacionados con el complejo inflamasoma en células EA.hy926. **43**
Tabla 3. Expresión génica de biomarcadores moleculares relacionados con antioxidantes en células EA.hy926. **44**

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El ipconazol es un fungicida de amplio espectro utilizado como agroquímico y plaguicida para proteger plantas de diversos cultivos, césped, flores ornamentales y coníferas. El ipconazol es estructuralmente como muchos otros compuestos triazólicos utilizados como pesticidas, y su forma de accionar se fundamenta en impedir la síntesis de esteroles en los hongos, especialmente contra zigomicetos, ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos a dosis de 20 g/tonelada de semilla. Existen pocos estudios sobre la tolerancia a los residuos preocupantes del ipconazol en productos vegetales y animals; sin embargo, se dispone de alguna información toxicológica como la DL_{50} en ratas para toxicidad oral aguda (1338 mg/kg machos y 888 mg/kg hembras), dérmica aguda (>2000 mg/kg ambos sexos) y respiratoria aguda (1,88 mg/L ambos sexos). En términos de toxicidad crónica/carcinogenicidad, el ipconazol pertenece a la clase de los triazoles y varias sustancias químicas de esta clase han inducido tumores hepáticos en ratones [1,2].

Los fungicidas triazol, como el ipconazol, se usa alrededor mundo como plaguicidas agroquímicos y, como ocurre con todos los plaguicidas, sólo pequeñas cantidades actúan sobre los objetivos y la mayoría de los residuos restantes se convierten en contaminantes ambientales que entran en los suelos agrícolas, el agua o el aire [3]. Además, varias formulaciones de fungicidas pueden ser menos degradables y más persistentes en el medio ambiente, lo que agrava la contaminación, dando lugar a una mayor exposición de los organismos no diana, tales como las personas y los animales [4,5]. También se han descrito varias formas de exposición a los fungicidas triazoles, como la exposición alimentaria a través de alimentos contaminados, la exposición no alimentaria a través del contacto dérmico y la inhalación de estos plaguicidas en lugares contaminados, que suponen un riesgo para la salud humana [6]. Otros estudios experimentales han demostrado que los triazoles pueden inducir citotoxicidad en diferentes células y tejidos animales, incluso afectar a la reproducción y el desarrollo en mamíferos [7, 8, 9, 10].

Los efectos citotóxicos producidos por los fungicidas triazoles pueden estar asociados principalmente al estrés oxidativo mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS), cuyos niveles excesivos pueden causar daños en los componentes celulares, llegando incluso a la muerte celular [11]. Muchas investigaciones *in vitro* e *in vivo* ya demuestran que plaguicidas de diversos tipos (piretroides, organofosforados, clorados, etc.) pueden producir efectos toxicológicos relacionados con una elevada producción de ROS en líneas celulares y tejidos animales, estos efectos oxidativos también se describen como uno de los principales mecanismos de los fungicidas triazoles [12,13]. Se ha informado que los triazoles producen aumentos significativos de ROS en las líneas celulares de mamíferos PC12 y HepG2 [14,15]. Otros estudios han encontrado una alta producción de ROS en el tejido hepático y renal de ratas expuestas a triazoles [16,17], las ROS pueden inducir respuestas celulares como la activación del complejo inflamasoma [18] o la apoptosis [19]. El inflamasoma es un complejo proteico citosólico que cuando se activa puede inducir una fuerte respuesta inflamatoria, desencadenando el escape de citoquinas proinflamatorias interleuquina 1β e interleuquina 18 (IL-18) e incluso induciendo la muerte celular [20]. Por otro lado, la función de la apoptosis es eliminar las células disfuncionales, y la familia *BCL2* es el más importante mediador de la apoptosis. Bax y Bak, dos moléculas proapoptóticas pertenecientes a la familia *BCL2*, cuando se activan permiten la permeabilidad de la membrana mitocondrial [21] y la liberación de varias proteínas tales como Cyt c que activaran las enzimas caspasas y, en última instancia, la apoptosis [22].

Considerando que se necesita más información sobre los efectos citotóxicos de los fungicidas triazólicos, la investigación evaluó la citotoxicidad del fungicida ipconazol en un modelo endotelial humano EA.hy926. Los efectos tóxicos del ipconazol se determinaron por medio del ensayo de viabilidad celular (MTT), la generación intracelular de ROS y la actividad de la enzima apoptótica caspasa-3/7 (*BAX, APAF1, BNIP3, CASP3 y AKT1)*, y estos ensayos se utilizaron para determinar las dosis de trabajo de ipconazol para la evaluación de la expresión molecular de genes asociados con la muerte celular, la activación del complejo inflammasoma y la actividad antioxidante.

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del ipconazol sobre la citotoxicidad asociada a estrés oxidativo en células endoteliales EA.hy926.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto citotoxico del ipconazol, en células endoteliales humanas EA.hy926 mediante el ensayo de viabilidad celular (MTT).
- Evaluar el efecto del ipconazol sobre el estrés oxidativo, en células endoteliales humanas EA.hy926 mediante el ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS/RNS) y óxido nítrico intracelular (ONi).
- Evaluar el efecto del ipconazol sobre la apoptosis en células endoteliales humanas EA.hy926 mediante el ensayo de la actividad caspasa 3/7.
- Evaluar el efecto del ipconazol sobre la expresión molecular de genes de estrés oxidativo, muerte celular e inflamasoma en células endoteliales humanas EA.hy926, mediante el ensayo molecular qPCR.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Soliman *et al*. [23] determinaron residuos de tiofanato metilo y propiconazol en frutas de uva y mango como indicadores de persistencia en el ambiente. Se analizaron extractos de fruta para tiofanato metilo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y mediante cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones (GC/ECD), respectivamente. Los resultados indicaron que el propiconazol tuvo un impacto ambiental menor, ya que el propiconazol tuvo períodos de semidesintegración de residuos más cortos, que fueron de 1 y 24 dias en la uva y 1 y 19 días en el mango, respectivamente, mientras que el tiofanato metílico tuvo períodos de semidesintegración de 2 y 3 días en el mango y la uva, respectivamente. Las tasas de degradación del propiconazol en las uvas y frutos de mango no cambiaron significativamente y tampoco las del tiofanato metilo. De acuerdo con el nivel máximo de residuos, los intervalos previos a la cosecha del propiconazol fueron de 3 y 7 días para las uvas y el mango, respectivamente, y los intervalos previos a la cosecha para el tiofanato metilo fueron de 15 días para las uvas y las frutas de mango. El propiconazol se consideraba generalmente menos peligroso para los seres humanos y alteraría en menor medida el medio ambiente debido a su degradación más rápida que la del tiofanato metilo.

Según Jiuyong *et al*. [24] en su investigación se evaluó los efectos citotóxicos de los fungicidas de alcohol triazol (TAF) en células humanas HeLa, A549, HCT116 y K562, y se estudió preliminarmente el mecanismo potencial de la citotoxicidad de los TAF. Los resultados mostraron que los TAF tenían toxicidad en células humanas con diferente nivel y selectividad citotóxica. La citotoxicidad de los TAF se resonó con una acción de dosis bifásica hormonal típica que produjo un patrón complejo de efectos estimulantes o inhibidores sobre la viabilidad celular. Entre los cinco TAF, el diniconazol reveló un rango más amplio de citotoxicidad para inhibir la viabilidad de las células adherentes y en suspensión, lo que provocó el encogimiento de las células HeLa y mostró una citotoxicidad más fuerte que el hexaconazol. Además, se observó la implicación de la generación de ROS en la citotoxicidad de los TAF en células humanas, y se caracterizó la apoptosis de células HeLa y la formación de cuerpo apoptótico en células K562 inducida por diniconazol. Los resultados indicaron que la citotoxicidad de los TAF con

diferentes estructuras en las células humanas dependía de su propia propiedad y especificidad celular, las células K562 eran las más susceptibles a los TAF y el diniconazol era el tóxico más fuerte.

Asimismo, Zhaoxian *et al*. [25], investigaron el metabolismo enantioselectivo de cuatro fungicidas de triazol quirales representativos (protioconazol, flutriafol, triticonazol y epoxiconazol) en microsomas de hígado de rata (RLM) utilizando LC-MS / MS. Se logró la separación inicial de los cuatro fungicidas quirales y protioconazol-desthio en Lux-celulosa-1. Los resultados demostraron que los enantiómeros R de flutriafol y triticonazol eran preferentemente metabolizados. El R, S-epoxiconazol acumulado con una vida media de 173 min. No hubo estereoselectividad para el protioconazol. Sin embargo se observe unnotable metabolismo estereoselectivo de protioconazol-desthio. Los resultados de la cinetica enzimatica reveló diferentes afinidades entre los enantiómeros y las enzimas metabólicas; ademas el modelado homólogo y los resultados del acoplamiento molecular indicaron que la enantioselectividad era parcialmente afinidades de unión enantio específicas con las enzimas CYP. Este estudio destaca un nuevo enfoque cuantitativo para el metabolismo estereoselectivo de agroquímicos quirales y proporciona datos más precisos sobre el riesgo de fungicidas de triazol.

Por otro lado, Harm *et al*. [26] investigaron los efectos de un grupo de seis fungicidas azólicos (imazalil, flusilazol, fluconazol, tebuconazol, triadimefón y ciproconazol) sobre la viabilidad celular usando un ensayo combinado de azul alamar/CFDA-AM y sobre el estrés oxidativo usando un ensayo fluorescente H2-DCFDA. Dado que el calcio tiene un rol importante en la supervivencia y el funcionamiento neuronal, los efectos de estos seis fungicidas azoles y mezclas binarias y cuaternarias de fungicidas azoles sobre la concentración de calcio intracelular ([Ca (2 +)] i) se investigaron utilizando microscopía de fluorescencia unicelular en células PC12 dopaminérgicas cargadas con el colorante fluorescente sensible al calcio Fura-2. Solo se observaron cambios modestos en la viabilidad celular y la producción de ROS; sin embargo, cinco de los seis fungicidas azoles indujeron una inhibición inespecífica de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), aunque con potencia variable. Los experimentos que utilizan mezclas

de IC_{20} binario y de IC10 cuaternario indicaron que los efectos inhibidores sobre los VGCC son aditivos. Los hallazgos combinados demuestran la modulación del Ca (2+) intracelular mediante la inhibición de los VGCC como un nuevo modo de acción de los fungicidas azoles.

Según Holečková *et al*. [27] analizaron la consecuencia de la formulación fungicida de triazol (tebuconazol / protioconazol) sobre la inducción de aberraciones cromosómicas (CA), intercambios de cromátidas hermanas (SCE) y fragmentación del ADN en linfocitos de cultivo bovino. Los resultados mostraron que la formulación de fungicida no indujo un número significativo de CA en células bovinas después de 24 horas de tratamiento; no obstante se observó una reducción de la división mitótica dependiente de la dosis, con el efecto más fuerte a 30,0 μg mL (-1) en ambos donantes (P <0,01 y P <0,001, respectivamente). La exposición prolongada de 48 horas provocó un aumento del nivel de roturas en los cultivos tratados (3,0-15,0 μg mL (-1); P <0,05) y una disminución significativa del índice mitótico (IM). El fungicida probado no produjo ningún cambio estadístico en la frecuencia de SCE después de 48 h de tratamiento; sin embargo, se visualizó una reducción representativa del índice de proliferación (IP) después de 24 horas, lo que indica la influencia del fungicida en la cinética del ciclo celular. La exposición prolongada de 48 horas causó citotoxicidad que se refleja en un valor de PI más bajo en relación con el control, principalmente a las concentraciones más altas de fungicida (30,0 μg mL (-1), P <0,001); usando sondas de pintura para los cromosomas bovinos 1, 5 y 7 (BTA1, BTA5 y BTA7) solo se detectaron niveles bajos de aneuploidías. Se indujo un aumento significativo de células poliploidías (P <0.05) con una dosis de 3.0 μg mL (-1) del fungicida passado las 48 horas.

Sánchez *et al*. [28] evaluaron la neurotoxicidad de los fungicidas triazoles en la respiración oxidativa mitocondrial y los lípidos en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas. Tuvo como objetivo evaluar la toxicidad *in vitro* de dos fungicidas triazólicos ampliamente utilizados, propiconazol y tebuconazol, para las mitocondrias utilizando células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas como un modelo celular *in vitro* usado en el estudio de la enfermedad de Parkinson. Se establecio que la viabilidad celular disminuyó con propiconazol 100 μM después de 24 y 48 h,

mientras que el tebuconazol requirió dosis más altas para afectar la viabilidad (200 μM a las 24 h). El potencial de membrana mitocondrial (MMP) se redujo con propiconazol 50 μM después de 24 horas, mientras que tebuconazol 200 μM redujo el MMP. Luego se midió la respiración oxidativa de las células SH-SY5Y utilizando un analizador de flujo XFe24 y propiconazol 100 μM redujo la respiración basal, la producción de ATP inducida por oligomicina y la respiración máxima inducida por FCCP en -40-50%, mientras que el tebuconazol no afectó la bioenergética mitocondrial en las concentraciones ensayadas.

El penconazol es un fungicida triazol sistémico utilizado principalmente en cultivos de uvas, con un nivel máximo de residuos (LMR) de 0,2 ppm en vino y uvas. Con el objetivo de identificar posibles biomarcadores de exposición al penconazol y posiblemente resaltar su modo de acción disruptivo endocrino, se utilizó un enfoque basado en la transcriptómica para detectar genes que están modulados transcripcionalmente por el penconazol, mediante el uso las células T-47D que fueron tratadas penconazol comercial o extractos de uva contaminados con penconazol durante 4 horas en dosis cercanas al LMR. El análisis demostro un grupo de genes comprometidos en la vía del cáncer de tiroides, lo que confirma el papel del penconazol en los efectos mediados por la alteración endocrina lo cual sugiere fuertemente un posible modo de acción en la carcinogénesis de tiroides [29].

Los fungicidas triazoles se utilizan ampliamente como fungicidas de amplio espectro y para diversas aplicaciones industriales. Sus residuos se han detectado con frecuencia en múltiples matrices ambientales y humanas. Por esta razón, un estudio evaluó cinco fungicidas triazoles de uso generalizado (bitertanol, hexaconazol, penconazol, tebuconazol y uniconazol) para determinar la actividad androgénica y antiandrogénica utilizando un receptor de andrógenos (AR) humano, donde se evaluó la actividad enzimática de CYP3A4 mediante Bioensayo P450-Glo™ CYP3A4. Los cinco fungicidas mostraron una actividad antiandrogénica moderada hacia la AR humano con una IC_{50} que oscilaba entre 9,34 μM y 79,85 μM. La actividad antiandrogénica no sufrió cambios significativos después del metabolismo mediado por microsomas hepáticos

humanos. Estos fungicidas inhibieron significativamente la actividad de CYP3A4 en las concentraciones ambientales relevantes y la potencia se clasificaron como tebuconazol > uniconazol > hexaconazol > penconazol > bitertanol con la IC_{50} de 0,81 μM, 0,93 μM, 1,27 μM, 2,22 μM y 2,74 μM, respectivamente. Esos resultados concluyen que los fungicidas triazoles y productos químicos estructuralmente similares debería considerar plenamente los posibles efectos disruptivos androgénicos y las influencias sobre la actividad de los CYP450 [30].

Una variedad de fungicidas triazoles como el ciproconazol (CYPRO), fluconazol (FLUC), flusilazol (FLUS), hexaconazol (HEXA), miconazol (MYC), penconazol (PEN), procloraz (PRO), tebuconazol (TEBU), triadimefón (TRIA) y triticonazol (TRIT) se evaluaron utilizando células de Leydig (MA-10) murinas y células T47D-ARE humanas transfectadas de manera estable con un elemento sensible a los andrógenos y un gen indicador de luciferasa. Seis conazoles provocaron una reducción en la secreción basal de testosterona (T) por las células MA-10 que varía del 61 % al 12 % en comparación con el control. La secreción de T se inhibió de forma dosis-dependiente por FLUS (IC 50 = 12,4 μM) o TEBU (IC 50 = 2,4 μM). No hubo cambios en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pudieran explicar la secreción alterada de T después de la exposición a los conazoles. Todos estos resultados muestran distintos efectos antiandrogénicos *in vitro* como el impedimento de la secreción de T y antagonismo de AR, lo que sugiere posibles efectos tóxicos testiculares [31].

El flusilazol (FLUS) es un fungicida triazol organosilícico de amplio espectro utilizado para proteger cereales y frutas de huerto de importancia económica. FLUS ha sido evaluado como agente citotóxico en células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas. El tratamiento con FLUS indujo citotoxicidad en células SH-SY5Y diferenciadas lo cual implica el daño producdo por dicho fungicida de triazol. Se observaron disminuciones significativas en los porcentajes de viabilidad celular. Además, la longitud de las neuritas se vio afectada negativamente por el tratamiento de FLUS en la concentración más alta.

Finalmente se ha demostrado que FLUS al ser utilizado de forma intensiva puede provocar un riesgo potencial para la salud humana y ambiental [32].

Un posible efecto citotóxico que podrían ocasionar los fungicidas traizoles sería la acumulación grasa en tejido hepático. Por ello, se evaluó la acumulación de triglicéridos en células hepáticas HepaRG humanas por efecto de una mezcla de ocho sustancias químicas (amiodarona, ácido benzoico, ciproconazol, flusilazol, imazalil, procloraz, propiconazol y tebuconazol) a dosis de 1-3 μM. Se observó una acumulación de triglicéridos pronunciada por efecto de la mezcla fungicida. El análisis del patrón de transcripción indicó cambios proesteatósicos sutiles en concentraciones bajas del compuesto, que no ejercieron efectos mensurables sobre los triglicéridos celulares [33].

En la actualidad se conoce que el TEB podría ejercer efectos nocivos sobre la salud de los mamíferos. Sin embargo, el mecanismo molecular implicado en la toxicidad del TEB no está definido del todo. Por ello, se analizaron los mecanismos de toxicidad inducida por TEB en las células intestinales. Demostrandose que TEB estimula la apoptosis por medio de la vía mitocondrial; asimismo, TEB desencadena estrés en el retículo endoplásmico (RE). La incubación con la chaperona química 4-fenilbutirato (4-PBA) alivió el estrés del RE y redujo la apoptosis inducida por TEB, lo que sugiere que el estrés del RE tiene un función importante en la mediación de la toxicidad inducida por TEB; ademas, la inhibición de ROS por la N-acetilcisteína (NAC) inhibió el estrés y la apoptosis del RE inducido por TEB. En conjunto, estos hallazgos sugieren que TEB ejerce sus efectos tóxicos en las células HCT116 al inducir la apoptosis a través del estrés del RE mediado por ROS y la vía apoptótica mitocondrial [34].

El fungicida TEB, un fungicida de triazol, se aplica con frecuencia en la agricultura para aumentar la obtención de alimentos. Aunque la TEB causa toxicidad hepática, rara vez se investigan sus efectos sobre la acumulación de lípidos celulares es por ello que, se estudiaron los efectos de la TEB sobre el metabolismo y la acumulación de lípidos en las células HepG2. Las células HepG2 se expusieron a TEB (0-320 μM) durante 1-24 h. Las células utilizadas con TEB (20-80 μM, 24 h) mostraron acumulación de lípidos;

ademas, TEB (20-80 μM, 1-12 h) aumentó la translocación nuclear de los receptores activados por el PPARs y la expresión de la captación de lípidos y marcadores relacionados con la oxidación, como la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) 2, FATP5 y carnitina palmitoiltransferasa 1. Los niveles de estrés oxidativo en las células tratadas con TEB (20-80 μM, 24 h) fueron mayores que los del control. TEB (20-80 μM, 24 h) también indujo la reducción del potencial de membrana mitocondrial y niveles más bajos de proteína microsomal de transferencia de triglicéridos en las células. Se concluye TEB indujo la acumulación de lípidos al alterar la expresión de moléculas que metabolizan los lípidos [35].

Los fungicidas de triazol estan asociados con toxicidad reproductiva en mamíferos, y se cuenta con información limitada respecto a las consecuencias generadas por los fungicidas de triazol sobre la función del trofoblasto placentario humano. TEB es un fungicida ampliamente utilizado frente al control de hongos que afectan los cultivos; sin embargo, al evaluar el efecto TEB sobre la viabilidad celular, el ciclo celular y la apoptosis en la línea celular de trofoblasto placentario humano HTR-8, se evidenció que la expresión de la proteína Bcl-2 disminuyó y el nivel de la proteína Bax aumentó después del tratamiento con TEB en células HTR-8. Los resultados demostraron que este fungicida indujo la apoptosis de las células del trofoblasto por medio de la vía mitochondrial; asimismo, TEB alteró la expresión de genes reguladores claves incluidos en la modulación de las funciones del trofoblasto. En conjunto, TEB suprimió la migración del trofoblasto humano al afectar la expresión de proteasas, hormonas, factores angiogénicos, factores de crecimiento y citoquinas, lo que sugieren que TEB debe ser considerado como un agente potencialmente peligroso para el embarazo humano [36].

El triazol TEB ha sido evaluado como inductor de muerte celular en cardiomioblastos H9c2 y en miocitos ventriculares de rata adulta (ARVM). El ensayo cometa y el análisis de transferencia Western Blot mostraron un aumento del daño del ADN y de los niveles de las proteínas p53 y p21 24 h después del tratamiento con TEB. Dichos hallazgos también mostraron que TEB activó la vía mitocondrial de la apoptosis, como lo

demuestra una reducción del potencial transmembrana mitocondrial, un aumento en la relación Bax/Bcl-2, la activación de las caspasa-9 y caspasa-3, una escisión de la polimerasa PARP y un aumento en la cantidad de células en la fase sub-G1. Además, TEB produjo la producción de ROS en las células cardíacas y, en consecuencia, aumentó las cantidades de MDA, el resultado final de la peroxidación lipídica. El tratamiento de cardiomiocitos con N-acetilcisteína, un eliminador de ROS, redujo el daño al ADN inducido por TEB y la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis [37].

El epoxiconazol (EPX) es uno de los plaguicidas más empleados alrededos del mundo, y su uso prolongado podría provocar efectos tóxicos en la salud humana que están asociados principalmente a sus residuos en los alimentos o exposición ocupacional en la agricultura. Ello llevó a estudiar el efecto tóxico del EPX sobe las células nerviosas PC-12, observándose efectos sobre citotóxicos en la posibilidad y la proliferación de las células PC12, también indujo daño del ADN, condensación nuclear, alteración de la red del citoesqueleto y la apoptosis. El ensayo bioquímico intracelular demostró que EPX induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y activa la caspasa-3. De hecho, EPX indujo la generación de ROS en las células neuronales, lo que se acompaña de un aumento de la peroxidación lipídica, confirmado por los altos niveles de MDA. Dichos resultados demuestran que los efectos genotóxicos y citotóxicos de EPX están mediados a través de una vía dependiente de ROS en las células PC12 [38].

Los efectos de los fungicidas triazoles tendrían como una de las dianas principales el sistema hepático, debido a que su principal mecanismo de acción es actuar sobre las CYP450. Por esta razón, ratones C57Bl/6J expuestos perinatalmente a dosis bajas de EPX, fueron evaluados por medio de análisis histológicos y transcriptómicos del hígado. Se observó que la exposición perinatal a EPOX induce efectos transgeneracionales con cambios fenotípicos, histológicos y transcriptómicos. Estos cambios dependen del sexo y la generación del animal es por ello que estas modificaciones conducen a una alteración del metabolismo hepático dando como resultado una diferencia en el tamaño de los hepatocitos. Más allá de estos mecanismos específicos, EPOX también parece tener un impacto más general sobre el metabolismo hepático a través del ritmo circadiano [39].

El ipconazol antifúngico ampliamente utilizado en la agricultura contra enfermedades de semillas de arroz, hortalizas u otros este se puede acumular con facilidad en el

ambiente, expone la integridad de la persona, los animales y el medio ambiente, se investigó el efecto citotóxico del ipconazol en células de neuroblastoma SH-SY5Y mediante pruebas de viabilidad celular (MTT), producción de ROS, actividad de caspasa3/7 y ensayos moleculares de los biomarcadores de muerte celular (Bax, Casp3, APAF1, BNIP3 y *Bcl2*); inflamasoma (NLRP3, Casp1 e IL1β); inflamación (NFκB, TNFα e IL6); y antioxidantes (NRF2, SOD y GPx). Las células SH-SY5Y se expusieron a ipconazol (1, 5, 10, 20, 50 y 100 μM) durante 24 h. El ipconazol, de manera dosis-dependiente, redujo la viabilidad celular y produjo una IC_{50} de 32,3 μM; también genero un aumento en la generación de ROS y la actividad de la enzima caspasa3/7 en células SH-SY5Y. Además, el ipconazol a 50 μM indujo una sobreexpresión de Bax, Casp3, APAF1 y BNIP3 (genes de muerte celular); NLRP3, Casp1 e IL1B (genes del complejo inflamasómico); y NFκB, TNFα e IL6 (genes de inflamación); también redujo la expresión de NRF2, SOD y GPx (genes antioxidantes). Dichos resultados muestran que el ipconazol debe considerarse como un factor en la presentación de neurotoxicidad o neurodegeneración [40].

2.2. Bases teóricas

Los compuestos azólicos se clasifican en triazoles e imidazoles y se utilizan en todo el mundo como fungicidas agrícolas, biocidas y antifúngicos de uso humano y veterinario [41]. El principal mecanismo de operación de los fungicidas azoles está asociado con la inhibición de ciertas vías de esteroidogénesis, mostrando inhibición de la enzima fúngica P450 lanosterol-14α-demetilasa [41], y en menor medida una acción contra las enzimas CYP51 y aromatasa [41,42]. Ello es un indicador de que la exposición a estos compuestos podría inducir alteraciones endocrinas en organismos no diana [41,42].

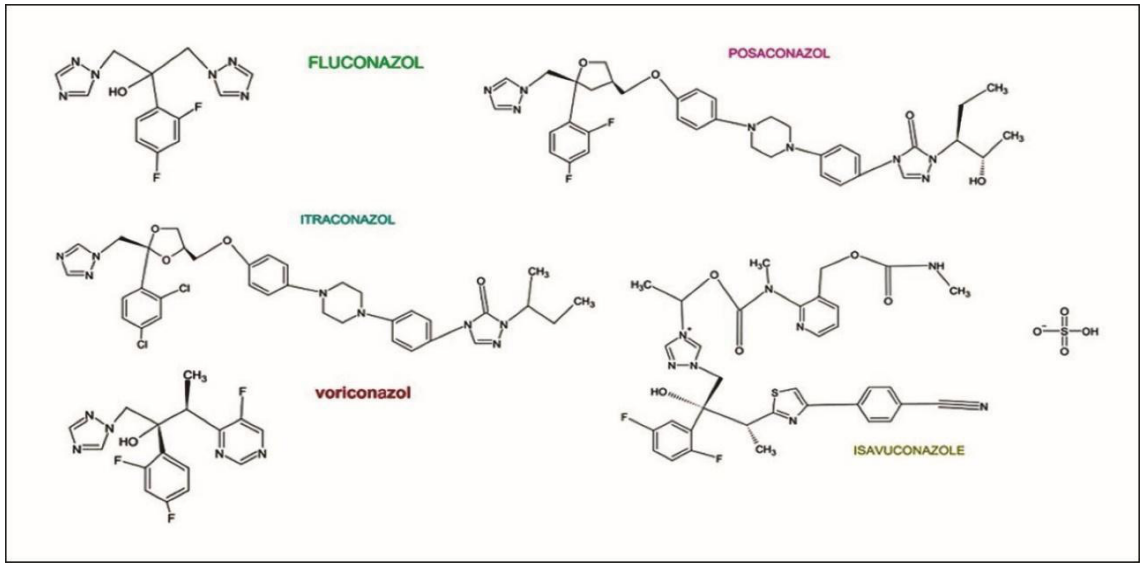
Los pesticidas triazoles son un tipo de fungicidas agrícolas muy eficientes en el control de hongos patógenos en los cultivos [41,43]. La aplicación de estos antifúngicos es imprescindible debido a la elevada amenaza que supone la contaminación fúngica en todos los cultivos del mundo [44]. La comercialización de este tipo de fungicidas supera el 10% de las ventas totales de plaguicidas, y esta comercialización aumenta cada año debido al cambio climático, la resistencia a fungicidas y la presencia de hongos invasores [45]. En la

actualidad, el uso y abuso generalizado de fungicidas triazoles es motivo de preocupación, ya que los fungicidas, tras su uso, pueden volver a permanecer de forma residual en diferentes ecosistemas, especialmente en el agua y el suelo, convirtiéndose en un contaminante ambiental peligroso para la salud humana, animal y medioambiental [42].

2.2.1 Triazoles

Los azoles son un conjunto diverso de medicamentos antifúngicos que tienen en común un anillo de imidazol unido a otros anillos aromáticos. Esto les da diferentes propiedades físicas, efectos terapéuticos y toxicidad. Hay dos grupos de azoles: los triazoles, que tienen tres nitrógenos en el anillo principal, como fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol; y los imidazoles, que tienen dos nitrógenos en el anillo, como miconazol, ketoconazol y clotrimazol [46].

Figura 1. Estructura química de fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol.



Fuente: Nocua Báez, Uribe Jerez et al. (2020).

2.2.2 Triazoles toxicidad experimental

Los estudios de los triazoles se enfocan principalmente sobre su mecanismo de acción, "por ello" en esta sección de la tesis nos enfocaremos en la actividad tóxica producida por estos fungicidas mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, destacando alguno de ellos.

A. Propiconazol

Este fungicida sistémico a base de triazoles se utiliza ampliamente en la industria agrícola por su amplio espectro contra hongos patógenos. Una de sus características cinéticas es que es absorbido por rizomas y hojas, y conducido rápidamente a las partes superiores de las plantas. [47,48]. Dentro de su mecanismo de acción, se observa que puede prevenir el crecimiento y reproducción de hongos al interferir con la biosíntesis de ergosterol e inhibir la desmetilación de esteroides [49]. Se utiliza ampliamente para el control de enfermedades fúngicas, como la mancha negra por alternaria, la antracnosis, el moho gris y el oídio, en frutas, hortalizas, cereales y otros cultivos de campo [47-50]. Sin embargo, una vez utilizado, es muy difícil controlar su eliminación del medio ambiente, lo que lo convierte en un contaminante ambiental nocivo para los organismos no objetivo. Por ejemplo, el propiconazol puede permanecer moderadamente en el medio ambiente porque es muy soluble en agua, lo que le permite entrar en el medio acuático a través de la lluvia y la escorrentía [50].

El efecto tóxico del propiconazol se ha estudiado experimentalmente *in vivo* e *in vitro*. Los estudios en ratas han demostrado un efecto tóxico del propiconazol a nivel reproductivo generacional [51], y alteraciones del metabolismo y daño hepático tanto en ratas [52,53], como en células de ratón [52] y células hepáticas humanas HepG2 [53]. Además, se sabe que el propiconazol puede convertirse en un contaminante acuático, de ahí que se hayan desarrollado varios estudios *in vivo* en el modelo experimental del pez cebra que demuestran que la exposición al propiconazol provoca alteraciones en el estado oxidativo, alteraciones del comportamiento [54], toxicidad reproductiva [55], endocrinas [56] y del desarrollo [57]. Además, un estudio en peces muestra que la exposición al propiconazol altera el metabolismo hepático y la función de la hormona tiroidea [58].

B. Penconazol

Es un fungicida triazol que inhibe la C-14-demetilasa en la biosíntesis fúngica de esteroles. El penconazol puede utilizarse como preventivo sistémico y curativo mediante aplicación foliar en diversos cultivos amenazados por la contaminación fúngica. El penconazol se utiliza principalmente contra los hongos patógenos Ascomycetes,

Basidiomycetes y Deuteromycetes, y enfermedades de los cultivos como el oídio, la sarna, la mancha anular y las royas. El penconazol es muy empleada alrededor del mundo, especialmente en cultivos frutales como manzanas, peras, melocotones, ciruelas, albaricoques, fresas; ornamentales; lúpulo; hortalizas; pepinos; tomates. Este amplio uso y su alta solubilidad en agua hacen de este compuesto un potencial contaminante ambiental que podría afectar a la salud humana, como demuestran varios estudios *in vivo* e *in vitro* [59].

En diferentes investigaciones se muestra que el penconazol ha producido experimentalmente *in vivo* e *in vitro* varios efectos tóxicos en organismos no diana. En ratas, el penconazol produjo desequilibrio del estado oxidativo, inflamación y alteraciones citoestructurales en el pulmón [60], y efectos neurotóxicos relacionados con el estrés oxidativo exacerbado [61]. En ratones, la exposición al penconazol provocó alteraciones en la microbiota intestinal y desequilibrios metabólicos [62], así como efectos embriotóxicos relacionados con un retraso en el desarrollo del sistema nervioso [63]. La exposición al penconazol en especies acuáticas como el pez cebra se comportó como un disruptor endocrino del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal [64], y causó efectos neurotóxicos del desarrollo embrionario [65,66]; y en el pez dorado, el penconazol causó alteraciones del perfil hematológico y sanguíneo [67]. En otras especies acuáticas como el cangrejo de río, el penconazol causó una marcada alteración de los niveles de enzimas antioxidantes [68]; mientras que, en embriones de rana se observaron malformaciones intestinales, edema, estrés oxidativo y alteraciones endocrinas [69]. Por otro lado, investigaciones *in vitro* mostraron un efecto de alteración endocrina en células T-47D [29], alteración androgénica en el receptor humano de andrógenos [30] y toxicidad reproductiva en células MA-10 y T47D-ARE [31].

C. Flusilazol

Es un fungicida triazólico de amplio espectro utilizado para proteger diversos cultivos. Su mecanismo de acción como agroquímico antifúngico consiste en inhibir el esterol 14 α-demetilasa de los hongos patógenos. Se sabe que el flusilazol tiene efectos curativos y preventivos que se utilizan para controlar una variedad de hongos patógenos,

incluidos Ascomycetes, Basidiomycetes y Deu-teromycetes spp, y enfermedades fúngicas conocidas como sarna del manzano, oídio, enfermedad de Sigatoka, mancha ocular, royas, podredumbre negra, que atacan a alimentos como manzanas, peras, albaricoques, ciruelas, melocotones, plátanos, uvas, remolacha azucarera, colza oleaginosa y cereales [70].

Varios estudios en animales y cultivos celulares han demostrado la citotoxicidad de la exposición al flusilazol. En roedores expuestos al flusilazol, se observó embriotoxicidad en el desarrollo [71], teratogenicidad y anomalías del aparato branquial [72] y retraso en el desarrollo esquelético embrionario [73]. En el pez cebra, el flusilazol provocó retrasos en el desarrollo, retrasos en la eclosión y alteraciones en la expresión génica de biomarcadores morfológicos [74]. En cultivos celulares, la exposición al flusilazol provocó una reducción de la viabilidad celular, un aumento del estrés oxidativo [32,33,75], citotoxicidad reproductiva [75], neurotoxicidad [32] y alteraciones en el metabolismo y la citoestructura hepática [33].

D. Tebuconazol

Es uno de los fungicidas más vendidos en todo el mundo y se ha utilizado para prevenir el crecimiento del micelio fúngico en diversos cultivos de frutas, verduras, cereales y frutos secos [76,77]. El tebuconazol es un fungicida sistémico de amplio espectro que podría detener el crecimiento fúngico bloqueando la síntesis de esteroles, componentes clave de las paredes celulares fúngicas, y al formar parte de la clase de los triazoles inhibe la desmetilasa y, especialmente, la enzima CYP51. Además de su acción antifúngica, se han descrito propiedades reguladoras del crecimiento de las plantas, por lo que es probable que el tebuconazol tenga fitotoxicidad y ralentice el crecimiento de las plantas cuando se aplica demasiado agente durante el tratamiento de las hojas o las semillas. Este efecto se debe a que los fungicidas triazoles actúan sobre la biosíntesis de la fitohormona giberelina, que inhibe la formación de las semillas y el crecimiento de las plantas [76,78].

En diversos estudios se determinó el efecto de tebuconazol en organismos no diana como mamíferos, peces, anfibios y cultivos celulares. Se ha descrito que la exposición a tebuconazol en roedores produce alteraciones multifactoriales como cardiotoxicidad y daños en el ADN [79], toxicidad reproductiva relacionada con el número y las funciones de las células de Leydig [80], alteración de los niveles séricos de testosterona y estradiol e inhibición de la actividad de la aromatasa [81], inducción de colitis y desregulación de la microbiota intestinal [82], alteración de los procesos cognitivos e inmunitarios [83] y alteración del metabolismo hepático mediante estrés oxidativo y daños en las células hepáticas [84]. También se ha notificado toxicidad reproductiva en el ganado vacuno, siendo evidentes la espermatotoxicidad y la alteración de la secreción de testosterona [85]. En el pez cebra, el tebuconazol se bioacumuló [86] y produjo trastornos nerviosos [87]. y en anfibios, se observó que el tebuconazol era un disruptor endocrino gonadal [88]. En cultivos celulares, se demostró que los efectos citotóxicos del tebuconazol exacerban el estrés oxidativo, la alteración de las enzimas antioxidantes y el daño del ADN [34-36], aumentan la actividad apoptótica celular [37,89] y la actividad genotóxica [90].

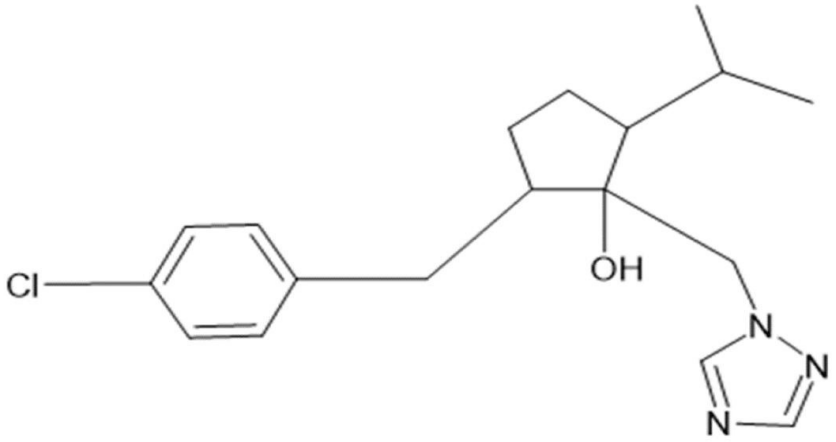
E. Ipconazol

Ipconazol es el nombre común ISO de (1RS,2SR,5RS;1RS,2SR,5SR)-2-(4-clorobencil)-5-isopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) ciclopentanol (IUPAC). El ipconazol es un fungicida principalmente agrícola que se creó en los años 80 y se usa ampliamente en todo el mundo. Se utiliza para controlar diversas enfermedades transmitidas por el suelo y las semillas en una amplia gama de cultivos, incluidos tubérculos y hortalizas de hoja, cereales y arroz, contra plagas como Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes [91,92]. En la actualidad, se está estudiando el abuso de ipconazol y sus consecuencias negativas sobre la salud animal y de las personas [93]. Sin embargo, los pocos estudios sólo mencionan la presencia de ipconazol en los alimentos [94].

Experimentalmente, se ha demostrado en estudios relacionados con la toxicidad del ipconazol su efecto neurotóxico al reducir la actividad locomotora, reducir la actividad

antioxidante y alterar la actividad GABAérgica en embriones de pez cebra [95], y aumentar el estrés oxidativo, la proinflamación y la actividad caspasa en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y [40].

Figura 2. Estructura química del fungicida Ipconazol [96]



Fuente: Ruiz Yance, Siguas Peña et al. (2023)

La toxicocinética de ipconazol se ha investigado en ratas luego de la administración oral a dosis únicas altas, bajas y dosis repetidas durante 14 días. Después de una dosis única, el ipconazol se absorbió ampliamente (> 90%) a una dosis baja (2 mg / kg). La mayor parte (> 80%) de la dosis alta (100 mg / kg) y baja fueron excretadas en 48 horas, principalmente mediante vía biliar (> 50% de la dosis aplicada). Residuos de excreción fueron detectados en el hígado después de la administración única (dosis baja y alta) y repetida, pero; en general, los niveles retenidos en los tejidos fueron bajos a las 120 horas después de la dosificación final (total <0,7% de la dosis única administrada); total ≤ 1,4% de una dosis diaria repetida). El ipconazol se metabolizó ampliamente con un máximo del 2,2% de la dosis administrada excretada sin cambios. Se produjeron grandes cantidades de fracciones de metabolitos a niveles bajos (cada uno <4% de la dosis). La hidroxilación y la conjugación fueron las principales vías metabólicas, y la estructura del anillo permaneció prácticamente intacta. La única excepción notable fue una pequeña cantidad (hasta el 6,9% de la dosis) de triazol libre (1,2,4-triazol) detectado en orina [97].

2.2.3. Estrés oxidativo

Es un fenómeno generado por una desigualdad entre la producción y acumulación de ROS en células y tejidos y la capacidad de un sistema biológico para estos productos reactivos. Las ROS desempeñan diversas funciones fisiológicas y se originan como subproductos del metabolismo del oxígeno; sin embargo, los factores estresantes ambientales (los rayos UV, las radiaciones ionizantes, los contaminantes y los metales pesados) y los xenobióticos ayudan a incrementar la generación de ROS, generando de esa forma el desequilibrio que conlleva al daño celular y tisular (estrés oxidativo). Varios antioxidantes han sido explotados en los últimos años por sus beneficios contra el estrés oxidativo, como la vitamina E, los flavonoides y los polifenoles [98].

Los radicales superóxido (O_2•−), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo (•OH) y el oxígeno singlete ($^1O_2$) son ROS generados como subproductos metabólicos por sistemas biológicos [99,100]. Los procedimientos que se lleva a cabo para la fosforilación de proteínas, la activación de diversos factores transcripcionales, la apoptosis y la diferenciación, necesitan de una producción adecuada de ROS y de la existencia dentro de las células que deben estar en un nivel bajo [101]. Cuando incrementa la generación de ROS, empiezan a presentar resultados nocivos en estructuras celulares relevantes como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [102]. Un gran conjunto de evidencias inducen a que el estrés oxidativo es el causante, con niveles de importancia, de la presencia y/o progresión de diferentes enfermedades (es decir, cáncer, diabetes, trastornos metabólicos, aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares) [103].

Las ROS son generadas por las mitocondrias, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, es decir, el O_2•− puede generarse por respiración celular, por lipoxigenasas (LOX) y ciclooxigenasas (COX) en el metabolismo del ácido araquidónico, y por células endoteliales e inflamatorias [104]. Sin embargo, estos orgánulos tienen una capacidad intrínseca de eliminación de ROS [105], ello no es lo adecuado para aproximarse a la necesidad celular de eliminar la cantidad de ROS producida por las mitocondrias [106].

Las células desarrollan un sistema defensivo antioxidante, que tiene como base componentes enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), para resguardarse del daño celular estimulado por ROS [107].

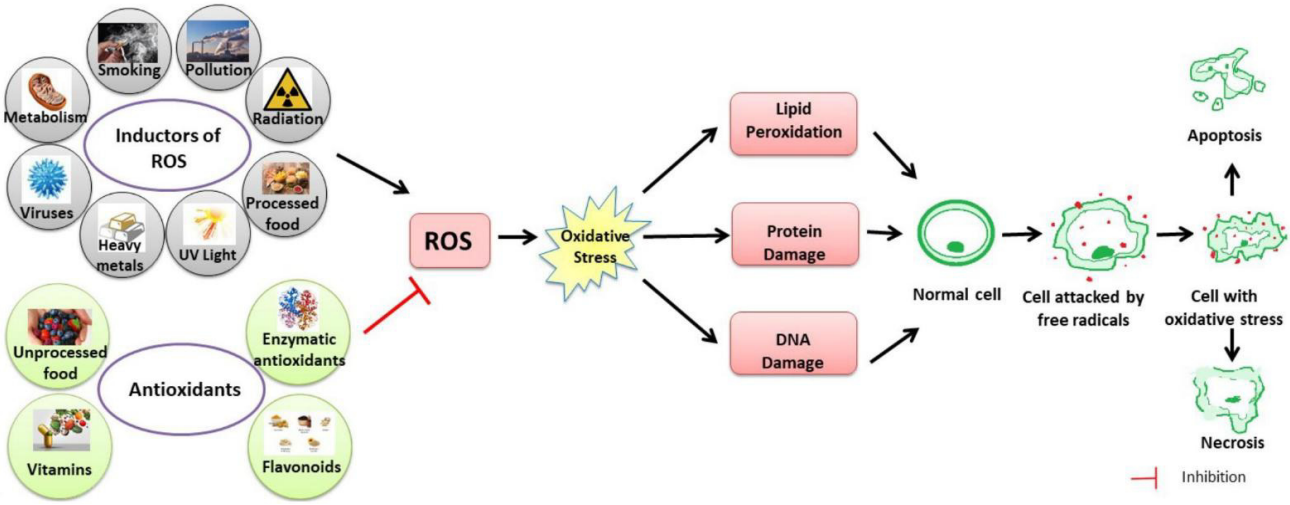
Cuando estan en concentraciones bajas o moderadas, los radicales libres ayudan al organism; estas son indispensables para simplificar varias estructuras celulares y para que los procesos de defensa del huésped los use para afrontar patógenos. Además, los fagocitos simplifican y almacenan radicales para que esten libres cuando los microorganismos patógenos invasores deben ser destruidos [108,114]. La función principal de las ROS para el sistema inmunológico se encuentran ejemplificado por las personas con enfermedad granulomatosa. Estos individuos son incapaces de producir $O_2\bullet-$ por causa de un sistema defectuoso de NADPH oxidasa [108,109]. Los radicales libres inclusive son participes en una serie de vías de señalización celular [111-113]. Pueden ser generados por isoformas de NADPH oxidasa no fagocíticas; frente a ello, los radicales libres desempeñan una función reguladora importante en las cascadas de señalización intracelular, en diversos tipos de células como fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso vascular, miocitos cardíacos y tejido tiroideo. Posiblemente, el radical libre más reconocido que se desempeña como molécula de señalización es el óxido nítrico (NO), este, es un intermediario relevante de célula a célula indispensable para una apropiada modulación del flujo sanguíneo, participa en la trombosis y es clave para la función neuronal normal [111]. Otra actividad fisiológica es la inducción de una respuesta mitogénica [111,112]. En resumen, los radicales libres, cuando se encuentran en niveles bajos o moderados, son relevantes para la salud de las personas.

Por otra parte, el exceso de los radicales libres y oxidantes dan lugar a un fenómeno conocido como estrés oxidative. Este es un proceso dañino que puede afectar negativamente varias estructuras celulares, como membranas, lípidos, proteínas, lipoproteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN) [109-114]. El estrés oxidativo surge cuando se presenta un desequilibrio entre la formación de radicales libres y la capacidad de las células para eliminarlos. Por ejemplo, un exceso de radical hidroxilo y peroxinitrito puede provocar peroxidación lipídica, dañando así las membranas celulares y las lipoproteínas; a su vez,

conducirá a la formación de compuestos de malondialdehído (MDA) y dieno conjugado, que se sabe que son citotóxicos y mutagénicos. Al ser una reacción en cadena radical, la peroxidación lipídica se propaga muy rápidamente y afecta a una gran cantidad de moléculas lipídicas [115]. Las proteínas son afectadas por el estrés oxidativo, alterando modificaciones conformacionales que definen una reducción o un deterioro de su función enzimática [113 ,115].

Incluso el ADN es propenso a sufrir lesiones relacionadas con el estrés oxidativo, la más representativa es la formación de 8-oxo-2′-desoxiguanosina (8-OHdG); se trata de una lesión del ADN particularmente perniciosa, responsable de la mutagénesis [116]. También genera una pérdida de información epigenética, probablemente por el deterioro en el activo de metilación de la isla CpG en los promotores de genes [117]. Vale la pena señalar que se han propuesto niveles de 8-OHdG en un tejido como biomarcador de estrés oxidativo [118]. Por supuesto, las células pueden poner en marcha varios mecanismos, como la reparación por escisión de bases (BER) o los antioxidantes, como respuesta de defensa contra las lesiones del ADN [110-113]. Si no se revisa estrictamente, el estrés oxidativo puede ser causante de la inducción de diversas enfermedades, tanto crónicas como degenerativas, asimismo de estimular el proceso de envejecimiento corporal y provocar patologías agudas (es decir, traumatismos y accidentes cerebrovasculares).

Figura 3 . Vínculo entre ROS, estrés oxidativo y sus efectos en el cuerpo humano.



Fuente: Emmanuel Silas, Bugaje et al. (2021)

El estrés oxidativo es el desequilibrio que se genera cuando se presenta una gran producción de radicales libres que supera la capacidad del organismo para neutralizarlos. La alteración de las reacciones químicas a nivel celular conduce a la aparición de radicales libres y peróxidos que afectan las estructuras intracelulares: proteínas, lípidos, ADN, con la alteración de los mecanismos intrínsecos a este nivel. Los radicales libres normalmente se producen en el organismo por efecto de factores externos, como la contaminación, el humo del cigarrillo, o internos, por el metabolismo intracelular cuando se superan los mecanismos antioxidantes [119].

2.2.4. Muerte celular

En los organismos multicelulares se presenta un trabajo permanente por tener un equilibrio homeostático entre la cantidad de células nuevas que se generan mediante la mitosis y la cantidad de células dañadas o no necesarias que se eliminan del cuerpo. Esta renovación constante de células es necesaria para el desarrollo de estructuras como los dedos de manos y pies, que surgen de las extremidades inicialmente palmeadas que se encuentran en el feto humano [120]. Los mecanismos por los cuales los animales regulan la mitosis, detectan anomalías celulares e inician el método de muerte celular programada conocido como apoptosis [121], el cual involucre una gran cantidad de genes reguladores. Algunos de estos genes reguladores actúan estimulando la mitosis, mientras que otros, la inhiben o inician la apoptosis u otras maneras de muerte celular programada como la piroptosis o la autofagia. La proliferación celular descontrolada puede generar enfermedades como el cáncer que provocan la muerte del organismo, mientras que un nivel desmesurado de muerte celular provoca enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson o la artritis reumatoide.

Aunque existe una red grande y compleja de productos genéticos que interactúan y participan en el ciclo y muerte celular, desde la década de 1990, ciertos receptores, enzimas y proteínas reguladoras han surgido como reguladores clave en estos procesos. Estos reguladores, cuando se presentan de forma anormal o cuando mutan, pueden tener una influencia directa sobre la maquinaria del ciclo celular, con algunos, por ejemplo, la familia de enzimas Bcl-2 [122] y la transglutaminasa 2 [123] ya sea estimulando la apoptosis o inhibiéndola dependiendo de su perfil de expresión, localización o conformación, la

inhibición de la apoptosis u otros mecanismos de muerte celular controlada pueden influir directamente en la susceptibilidad de un cáncer a los fármacos quimioterapéuticos, resultando en muchos casos en resistencia a los fármacos.

La forma mejor caracterizada y prevalente de muerte celular controlada se denomina "apoptosis", del griego que denota "caída", como cuando las hojas caen de un árbol, mientras que la forma incontrolada de muerte celular suele denominarse "necrosis" del Griego que denota "matar". La apoptosis es el proceso en donde una célula no crece y ni se divide y, por el contrario, ingresa en un proceso que, por último, genera la muerte controlada de la célula sin que su contenido se derrame al entorno circundante. A la apoptosis además se la denomina a veces muerte celular programada. La iniciación de la apoptosis esta regulada por la activación de una serie de proteasas cisteína-aspárticas llamdas caspasas. Hay dos categorías de caspasas, las caspasas iniciadoras y las caspasas ejecutoras [124]. Ni bien se detecta el daño celular, las caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9) se activan a partir de procaspasas inactivas y pasan ha activar las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7). La activación de estas genera una cascada de efectos que resulta en la fragmentación del ADN por activación de endonucleasas, destrucción de las proteínas nucleares y del citoesqueleto, entrecruzamiento de proteínas, expresión de ligandos para células fagocíticas y formación de cuerpos apoptóticos [125,126]. En términos generales, la apoptosis se puede distinguir de la forma no programada de muerte celular: la necrosis, tanto visualmente bajo el microscopio como mediante una serie de técnicas de biología molecular; incluyendo citometría de flujo con tinción con anexina V-FITC y ensayos de fragmentación de ADN.

En la apoptosis, los cuerpos apoptóticos que incluyen el contenido de la célula muerta pueden ser fagocitados por las células circundantes, aunque este comportamiento se observa principalmente en cultivos celulares [124], las células *in vivo*, como los macrófagos, “a menudo” eliminan las células apoptóticas antes de que se fragmenten dando como resultado una contención del tejido lesionado y, como resultado, reduce el riesgo de daño colateral a las células circundantes.

El proceso de apoptosis está altamente conservado dentro de los organismos multicelulares y está controlado genéticamente [126]. La propia célula puede iniciar la apoptosis cuando detecta daños a través de varios sensores intracelulares; una articulación llamada vía intrínseca. Sucesivamente, puede resultar de la interacción entre una célula del sistema inmunológico y una célula dañada, lo que se conoce como vía extrínseca de la apoptosis [127,128]. En el cuerpo humano, se estima que aproximadamente 1×10^9 células sufren apoptosis por día [129]. Tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis funcionan sinérgicamente para asegurar que los organismos multicelulares mantenerse sanos y que las células defectuosas se eliminen del organismo. La falta de regulación de la apoptosis puede provocar las patologías que se presentan en muchas enfermedades; por ejemplo, en enfermedades degenerativas como el Alzheimer, donde la muerte neuronal parece iniciarse mediante la activación de caspasas, un grupo clave de enzimas está involucrado en la apoptosis [130,131]; sin embargo, una apoptosis demasiado pequeña puede provocar el crecimiento y la fragmentación incontrolados de las células que se observan en el cáncer.

Figura 4. Componentes principales de las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis.

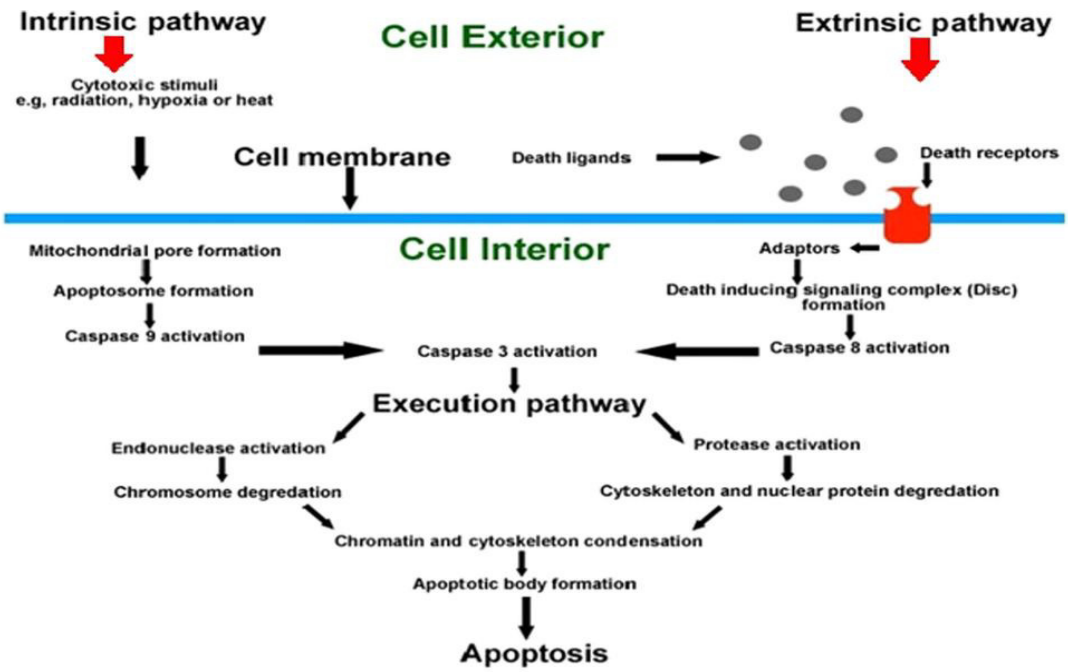


Figura 4. La vía intrínseca de la apoptosis la inicia la propia célula en respuesta al daño. La vía extrínseca se inicia por medio de receptores de muerte estimulados por células del

sistema inmunológico. Ambas vías convergen cuando se activa la caspasa 3 “caspasa verdugo”, lo que provoca la muerte celular [120-131].

2.2.5. Complejo inflamasoma

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que residen predominantemente en el citoplasma de las células inmunes innatas; también se encuentran en linfocitos y epitelios [132]. Hasta la fecha, su función se ha asociado con la patogénesis de diversas enfermedades, incluidos trastornos metabólicos, enfermedades inflamatorias y trastornos neurodegenerativos, así como cáncer [133,134]. Además, un número cada vez mayor de estudios sugiere su implicación en neoplasias malignas hematológicas.

Un inflamasoma se define como un complejo multiproteico citoplasmático que consta de los siguientes componentes:

- Receptores de reconocimiento de patrones (PRR): moléculas que pertenecen predominantemente a la familia de receptores tipo NOD (NLR) que manifiestan una amplia gama de activadores; además, los receptores ausentes en el melanoma-2 (tipo AIM2) y la pirina también se puede considerar como PRR que conforman los inflamasomas [135], y sirven como detectores exclusivos de ADN exógeno y toxinas, respectivamente [132,136]. El componente PRR es esencial para que el inflamasoma inicie su función.
- Proteína tipo speck-like relacionada a la apoptosis que incluye un dominio de reclutamiento de caspasa (ASC), una proteína adaptadora compuesta por un dominio de pirina (PYD), que permite la asociación con el componente PRR, y un dominio de reclutamiento y activación de caspasa (CARD), que facilita la unión de pro-caspasa-1 al complejo PRR-ASC. La proteína adaptadora está ausente una vez que PRR contiene el dominio CARD [135].
- Pro-caspasa-1, una forma inactiva de caspasa-1, una proteasa que escinde los precursores de las citoquinas IL-1β e IL-18 y otras proteínas (ej. gasdermina D) [135]. Se activa tras el ensamblaje del inflamasoma, que se provoca al detectar una señal de activación específica mediante PRR y la posterior asociación de los

componentes discutidos [135]. Como resultado, la procaspasa-1 se autoescinde para formar caspasa-1 activa [137].

-

Figura 5. Los componentes del complejo inflamasoma.

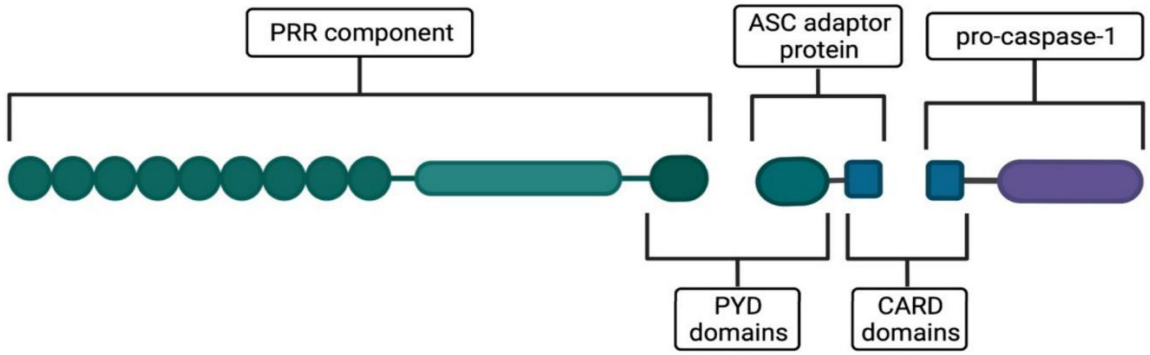


Figura 5. Los componentes del complejo inflamasoma. PRR: componente que detecta señales de activación del inflamasoma. ASC: una proteína adaptadora que permite la asociación de PRR con pro-caspasa-1. Procaspasa-1: componente efector del complejo inflamasoma. Dominios PYD: dominios que permiten la asociación de PRR con ASC. Dominios CARD: dominios que permiten la asociación de pro-caspasa-1 con el complejo PRR-ASC. Abreviaturas: PRR: receptor de reconocimiento de patrones; ASC: proteína tipo speck-like relacionada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa; PYD: dominio pirina; CARD: dominio de activación y reclutamiento de caspasas [138].

La nomenclatura de los inflamasomas es un derivado de los PRR integrados en el complejo [135]. Actualmente, los científicos reconocen sólo unos pocos inflamasomas, que incluyen la bien establecida familia NLR que esta compuesta por el dominio de pirina-3 (NLRP3), la familia NLR que contiene el dominio de pirina-1 (NLRP1) y la proteína que contiene el dominio-CARD de la familia NLR. -4 (NLRC4) [135]. Sin embargo, se informa que otros PRR forman complejos inflamasómicos alternativos [135]; siendo el inflamasoma NLRP3 el más representativo. Otros inflamasomas se comportan de manera similar, aunque pueden aplicarse algunas diferencias [132].

La activación del inflamasoma NLRP3 necesita de dos pasos. El primero es el cebado, que permite la transcripción de los componentes del inflamasoma y los sustratos de caspasa-1 [135,139]. Se activan las vías de transducción específicas mediante ciertos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daños (DAMP, también conocidos como alarminas). Las citocinas de la familia IL-1 también provocan el cebado, a menudo en el mecanismo de retroalimentación positiva [139]. La detección de estas señales requiere receptors; los PRR a menudo cumplen esta función, transduciendo la señal por medio del factor de transcripción NF-κB, actuando así sobre la expresión génica [132,139].

El segundo paso es el ensamblaje de los componentes del inflamasoma (NLRP3, ASC y pro-caspasa-1) seguido de la agregación homotípica de multímeros recién formados [132]. Este proceso se desencadena mediante la llamada señal dos. En primer lugar, varios compuestos activadores inducen el ensamblaje de todo el complejo proteico con la posterior activación de la caspasa-1; sin embargo, la NLR no siempre los detecta directamente [135]; a menudo responde a eventos celulares como la salida de iones, la fuga lisosomal y la formación de las ROS [132,135]. Además, otros activadores importantes son los metabolitos de las purinas (p. ej., ATP extracelular), las proteínas de choque térmico (HSP) y la proteína del grupo 1 de alta movilidad (HMGB1) [140,141]. En particular, la respuesta ROS requiere la interacción de la proteína quinasa NEK7 con NLR [132], lo que muestra la complejidad de las redes de señalización.

Tras la activación, la caspasa-1 se desagrega formas precursoras de IL-1β, IL-18, así como otras partículas, por ejemplo, gasdermina D (GSMD) [132]. Las citoquinas de la familia IL-1 actúan sobre varios tipos de células promoviendo y mejorando las respuestas inflamatorias [142]; también se informa que contribuyen a la progresión del cáncer [142]. Cuando el inflamasoma está hiperactivado, la escisión de GSMD inicia la formación de poros en la membrana celular [143]. Posteriormente, conduce a una forma específica de muerte celular, la piroptosis [143]; a medida que una célula muere, libera grandes cantidades de DAMP, lo que activa una respuesta inflamatoria aún más potente en el mecanismo del circuito de retroalimentación positiva [144]. Los mecanismos relacionados con la función inflamasómica parecen desempeñar un papel importante en las enfermedades

cardiovasculares. Actualmente, múltiples ensayos clínicos están dirigidos a la familia IL-1 en neoplasias hematológicas [140,141], examinando predominantemente los valores terapéuticos de anakinra (antagonista de IL-1R) o canakinumab (anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-1β) [140,141]. En particular, podría ser razonable actuar sobre la base molecular de su liberación, es decir, el inflamasoma. Además, hallazgos recientes mostraron la contribución del inflamasoma NLRP3 a la hematopoyesis adecuada, ya que influye en la salida y la localización de las células madre hematopoyéticas (HSC) [143], mientras que se ha propuesto que el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) daña HSC de manera dependiente del inflamasoma NLRP3 [145]. También vale la pena considerar el papel del inflamasoma como biomarcador de susceptibilidad y gravedad de enfermedades. Dado que un número cada vez mayor de estudios se centra en la contribución de los inflamasomas a las patologías hematológicas, se decidió resumir el estado del arte en la investigación en hematología dirigida a los inflamasomas.

Figura 6. Mecanismos simplificados de cebado y activación del inflamasoma NLRP3.

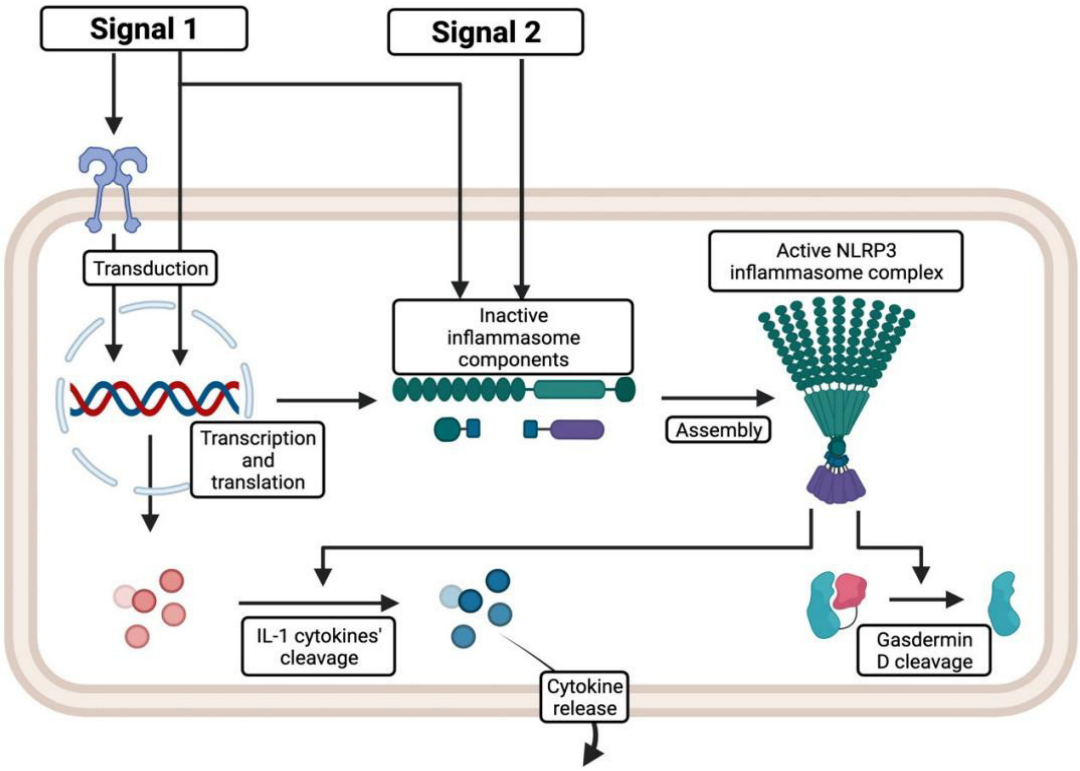


Figura 6. Mecanismos simplificados de cebado y activación del inflamasoma NLRP3. Señal 1: cebado: la detección de DAMP o PAMP específicos permite la transcripción y traducción de componentes inflamasómicos inactivos y citocinas inmaduras de la familia IL-1. Señal 2: Activación: el dominio NLR reconoce activadores específicos que provocan la asociación de los componentes del inflamasoma y el posterior ensamblaje de todo el complejo del inflamasoma. Luego, el inflamasoma escinde sus sustratos, predominantemente las citoquinas IL-1β e IL-18, lo que lleva a la respuesta inflamatoria. La escisión de gasdermina D conduce a la creación de poros de membrana y a un tipo específico de muerte celular, la piroptosis [138].

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Investigación

El estudio es experimental, realizado con 6 experimentos independientes en células de endoteliales humanas EA.hy926.

3.2. Consideraciones éticas

Al ser un estudio *in vitro* con células neuronales, no implica en ningún momento el uso de animales experimentales u otro modelo que deba ser sometido a un comité de ética.

3.3. Diseño metodológico

Materiales y métodos

A. Cultivo celular

Las células humanas EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) indiferenciadas se alcanzaron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). EA.hy926 es una célula híbrida somática que puede utilizarse para la investigación de enfermedades cardiovasculares. Las células se cultivaron y pasificaron en DMEM con FBS (10%) y 50 mg/L de gentamicina, penicilina y estreptomicina. Además, se incubaron en humedad con un 5% de CO2 y un 95% de aire, y a 37 °C; el medio de cultivo se cambió cada 24 horas.

Las células se trataron con ipconazol (1, 5, 10, 20, 50 y 100 µM, disuelto en DMSO) en DMEM-F12 (sin rojo de fenol) con 1% de FBS durante 24 horas. También se utilizó un grupo de control con vehículo (0,1% de DMSO) en cada experimento, y para mantener las condiciones fisiológicas de las células EA.hy926, se utilizaron al menos de 15 pases [14].

Subcultivos

Las células se sembraron en frascos de 25 mL, se utilizó DMEM-F12 con 10% de suero bovino fetal. Se esperó aproximadamente de 3 a 4 días para alcanzar confluencias del 60%, cada día se cambió el medio de cultivo. Para los subcultivos, se quito todo el medio de cultivo y se tripsinizaron las células (2-3 mL) durante 5 min en una

incubadora, después se resuspendieron las células con tripsina y se centrifugaron a 1500 rpm/4°C/5 min. Se quitó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 4 mL de medio de cultivo, 2 mL por matraz nuevo, y se añadieron 4 mL para un volumen final de 6 mL. Las células sembradas alcanzaron el 80% de confluencia en menos tiempo. Se realizaron dos subcultivos más; tras el subcultivo, se observó que las células alcanzaban una confluencia superior al 80% a las 24 h, y se decidió subcultivarlas en placas transparentes de 96 pocillos (200 µl en cada pocillo y 1x105 células por pocillo).

B. Evaluación de la viabilidad celular (MTT)

En el ensayo MTT debe observarse si las mitocondrias de las células viables son capaces de disminuir el reactivo de tetrazolio-MTT a formazán [15]. Despues de los tratamientos con ipconazol, se añadió 0,5 mg/ml de MTT como concentración final a cada pocillo y se incubó durante 2 h a 37°C y 5% de CO2, este tiempo permitió a las células EA.hy926 metabólicamente activas (1x105 células por pocillo) disminuir el tetrazolio-MTT (color amarillo) a una sal formazán (color púrpura). Tras 2 h de incubación, se quitó el sobrenadante de cada pocillo y se agregaron 150 µl de DMSO para solubilizar la sal de formazán. La absorbancia se midió a 540 nm (lector de microplacas SPECTROstar BMG). La viabilidad celular se representa como % del control.

C. Producción de ROS

El estrés oxidativo puede evaluarse por medio de la producción intracelular de ROS tomando en cuenta los protocolos estandarizados utilizando el ensayo de fluorescencia DCFH-DA [14]. El DCFH-DA entra en la célula y es hidrolizado por esterasas que admiten la liberación de DCFH y su reacción con ROS para producir un compuesto fluorescente detectable. Posteriormente a los tratamientos con ipconazol, se añadieron 10 µM de DCFH-DA a cada pocillo (2×105 células/pocillo en condiciones de incubación) en placa negra de múltiples pocillos durante 30 min, y se midió inmediatamente en un lector de (fluorímetro FLx800, BioTek, VT, EE.UU.) a 485 nm/530 nm (λ excitación/λ emisión).

D. Ensayo apoptótico con actividad Caspasa3/7

Se sembraron células EA.hy926 (15x103 células/pocillo) en placas negras de 96 pocillos. Tras los tratamientos con ipconazol, se preparó y utilizó Apo-ONE® Caspasa3/7 siguiendo las instrucciones del fabricante (sustrato fluorescente de caspasa3/7, rodamina 110 Z-DEVD- R110, y tampón de lisis celular bifuncional). El tampón lisará las células EA.hy926 cultivadas, y el sustrato y el tampón se combinarán para obtener el reactivo Apo-ONE® Caspasa 3/7 que se añadirá directamente a cada pocillo. La rodamina 110 emite fluorescencia a 485/528 nm (λ excitación/λ emisión), que se midió con el lector de placas (FLx800, BioTek, VT, EE.UU.). El producto fluorescente generado es una señal de caspasa3/7 activa en las células. Los datos se evaluaron como % del control [14]. Las células EA.hy926 (15 × 103 células por pocillo) se cultivaron en una placa negra de 96 pocillos y se expusieron a ipconazol (1-100 μM) durante 24 h. Tras el tratamiento, se preparó el ensayo Apo- ONE®Caspasa-3/7 de acuerdo con las directrices del fabricante. Se sacaron de la incubadora las placas de 96 pocillos que contenían las células tratadas, se añadieron 100 μl de reactivo Caspasa-3/7 homogéneo a 100 μl de medio de cultivo que contenía las células previamente tratadas en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente por un tiempo de 60 min en la oscuridad. Se midió la fluorescencia (longitud de onda de excitación 485 ± 20 nm, longitud de onda de emisión 528 ± 20 nm) utilizando el lector de placas (FLx800, BioTek, EE.UU.).

E. Ensayo de PCR en tiempo real

Las células EA.hy926 se sembraron en matraces de 25 mL por triplicado para cada condición (control, vehículo, ipconazol 20 μM e ipconazol 50 μM). Tras 24 horas de los tratamientos, se tuvo ARN total empleando NucleoSpin®-RNA-Plus (Macherey-Nagel, Alemania, basado en el uso de columnas de sílice) según las requisitos del fabricante. El ARN total se cuantificó utilizando un nanoespectrofotómetro (Microdigital, Seúl, Corea), obteniéndose relaciones A260/A280 cercanas a 2,0 en todas las muestras. La síntesis de ADNc se obtuvo a partir de 1 μg de ARN total mediante retrotranscripción empleando el kit de síntesis de ADNc qPCRBIO (PCRBiosystems, PA, EE.UU.) segun las condiciones del fabricante. Por último, el

ADNc se diluyó en agua libre de nucleasas (v:v,1:2) y se almacenó a -80 °C. Ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) para evaluar la expresión de genes asociados con la muerte celular (BAX, CASP3, APAF1, BNIP3 y *BCL2*), inflamasoma (NLRP3, CASP1 e IL1β), inflamación (NFκB, TNFα e IL6) y la capacidad antioxidante (NRF2, SOD y GPx) se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real (BioRad CFX, CA, EE.UU.), utilizando ICgreenen bajo el mismo sistema. Para la RT-PCR, los resultados se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real, utilizando ICgreen Master, un sistema de PCR ICgreen Master (BioRad CFX, CA, EE.UU.), utilizando ICgreen Mastermix (Nippon Genetics, Duren, Alemania) respetando las condiciones del fabricante. Para la RT-PCR, se utilizaron cebadores con concentraciones de 400 nM, y el protocolo de termociclado fue: 95 °C durante 2 min, y 40 ciclos de 5 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. Las eficiencias de los datos brutos utilizando el software LinRegPCR [18]

Tabla 1. Secuencia de cebadores

Genes relacionados con la muerte celular
BAX (Bcl-2-asociado a la proteina X) 'CCCCCGAGAGGTCTTTTTCC' 'CCTTGAGCACCAGTTTGCTG'
CASP3 (Caspasa 3) 'GTGGAGGCCGACTTCTTGTA' 'TTTCAGCATGGCACAAAGCG'
APAF1 (Apoptotic protease-activating factor 1) 'TCTTCCAGTGGTAAAGATTCAGTT' 'CGGAGACGGTCTTTAGCCTC'
BNIP3 (BCL2-interacting protein 3) 'CCTCAGCATGAGGAACACGA' 'GCCACCCCAGGATCTAACAG'
BCL2 (B-cell lymphoma 2) 'TCTCATGCCAAGGGGGAAAC' 'TCCCGGTTATCGTACCCTGT'
P53 (Tumor protein P53) 'GAACAAGTTGGCCTGCACTG' 'GAAGTGGGCCCCTACCTAGA'
AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1) 'GAAGGACGGGAGCAGGC' 'TGTACTCCCCTCGTTTGTGC'

Genes relacionados con el complejo inflamasoma
NLRP3 (NLR pyrin domain containing 3) *'CCCCGTAATCAACGGGACAA' 'AGCCAAATGCTTACCAGAAAGT'*
CASP1 (Caspasa 1) *'GAAAAGCCATGGCCGACAAG' 'GCCCCTTTCGGAATAACGGA'*
IL1β (Interleukin-1 beta) *'CCAGCTACGAATCTCCGACC' 'TATCCTGTCCCTGGAGGTGG'*
NFκB (Nuclear factor kappa B) *'TTTTCGACTACGCGGTGACA' 'GTTACCCAAGCGGTCCAGAA'*
TNFα (Tumor necrosis factor alpha) *'CTGGAAAGGACACCATGAGCA' 'TCTCTCAGCTCCACGCCATT'*
IL6 (Interleukin 6) *'CCAGTACCCCCAGGAGAAGA' 'CAGCTCTGGCTTGTTCCTCA'*

Genes relacionados con biomarcadores antioxidantes
NRF2 (Nuclear factor erythroid related factor2) *'CTGGTCATCGGAAAACCCCA' 'TCTGCAATTCTGAGCAGCCA'*
SOD (Superoxide dismutase) *'CCACTGCTGGGGATTGATGT' 'CGTGGTTTACTTTTTGCAAGCC'*
GPx (Glutathione peroxidase) *'TTCGAGCCCAACTTCATGCT' 'CGATGTCAGGCTCGATGTCA'*

F. Materiales y reactivos

El ipconazol (C18H24ClN3O), con una pureza del 98,96% (g/g), se obtuvo del grupo LGC (Barcelona, España). El bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT), la gentamicina, la penicilina G y la estreptomicina, el diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA), la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, D8537) se adquirieron de la empresa Sigma-Aldrich (Madrid, España), el dimetilsulfóxido (DMSO) de grado analítico y todos los demás reactivos habituales de laboratorio se obtuvieron de Panreac Química (Barcelona, España). El ARN nucleoespinado, la síntesis de ADNc qPCRBIO, la amplificación ICgreen-PCR, el medio de cultivo DMEM y el suero fetal bovino (FBS) procedían de Cultek (Madrid, España). El kit Apo-ONE® Homogeneous Caspasa-3/7 Assay se adquirió a Promega

(Madison, WI, EE.UU.). Los otros reactivos químicos empleados eran de alta pureza para biología celular y molecular y se encontraban desocupados en el laboratorio.

Reactivos y kits	*Materiales*
Medio de cultivo DMEM-F12 (rojo fenol)	Pipetas Pasteur
Medio de cultivo DMEM-F12 (sin rojo fenol)	Flask 25 mL
Penicilina-estreptomicina con anfotericina B	Microplacas blancas 96
Reactivo SYBR GREEN	Microplacas 96 PCR
Reactivo sintesis cDNA	Microplacas 6 pocillos
Tripsina frasco x 0.05%	Microplacas negras 96
Suero Fetal Bovino 500 mL	Tubos cónicos de 15 mL
Hidroperóxido de Tert-Butilo frasco 100 mL	Tubos cónicos de 50 mL
L-glutamina, frasco 200 mM	Rascadores celulares
Azul de Tiazolil Tetrazolio Bromuro	Rack para tubos de 1,5 mL
Reactivo para extraccion de RNA	Puntas de pipeteo 1-1000 uL
Ácido tiobarbitúrico	Micropipetas 0.5-1000 uL
Buffer fosfato	Tubos cónicos de 1,5 mL
Kit de casapsa 3/7	Crioviales de 2 mL
Agua libre de nucleasas	Filtros de 0.40 um

Agua ultrapura	Jeringas de 10 mL
Primers	Papel secante
DAF-FM-DA	Cintas de autoclavado
Dimetil sulfóxido	Puntas cónicas azules

G. Equipos

Incubadora de CO_2, termociclador a tiempo real, espectrofluorimetro, lector de ELISA, baño Maria, microscopio invertido, cabina de flujo laminar, balanza analítica, centrífuga refrigerada, refrigeradora/congeladora.

3.5. Población de estudio

Las células EA.hy926 son una poderosa herramienta para la investigación de enfermedades cardiovasculares; ademas las células EA.hy926 son una notable línea celular híbrida somática muy empleada en la investigación de enfermedades cardiovasculares. Estas células poseen características únicas que las hacen invaluables para analizar diferentes aspectos de las propiedades de las células endoteliales asociadas con la angiogénesis, la homeostasis/trombosis, la regulación de la presión arterial y la inflamación. La distribución citoplasmática de los cuerpos de Weibel-Palade y los orgánulos específicos de tejido en las células EA.hy926, observada a través de microfotografías electrónicas, presenta sus funciones diferenciadas de las células endoteliales. Una de las ventajas principales de las células EA.hy926 es su capacidad para sufrir más de 100 duplicaciones de población conservando sus propiedades celulares. Esta longevidad asegura una fuente de células sostenible y estables para experimentos y estudios a largo plazo. Duplicando 12 horas, estas células exhiben una rápida proliferación, lo que ayuda los flujos de trabajo experimentales y admite la creación eficiente de las cantidades de células necesarias para estudios de mayor trascendencia. Las células EA.hy926 han probado ser un punto de inflexión en la investigación cardiovascular, particularmente en la purificación de la enzima convertidora de endotelina (ECE). Las células EA.hy926, derivadas de células endoteliales de la vena

umbilical humana transformadas, surgen como una alternativa confiable para analizar la actividad de la ECE. Este progreso abre nuevas posibilidades para estudiar el papel de la ECE en las enfermedades cardiovasculares y generar posibles intervenciones terapéuticas. Las células EA.hy926 ofrecen una herramienta excepcional para estudios en el ambito de la ciencia cardiovascular. Su longevidad, rápida proliferación y capacidad para imitar funciones de células endoteliales diferenciadas las convierten en un recurso valioso para investigar diversos aspectos de las enfermedades cardiovasculares. Ya se ha estudiando angiogénesis, homeostasis/trombosis, regulación de la presión arterial, inflamación o explorando el papel de la ECE, estas células proporcionan a los investigadores una plataforma indispensable para progresar en la comprensión de la salud cardiovascular y desarrollar tratamientos innovadores.

3.6. Muestra de estudio

Cultivos celulares endoteliales EA.hy926 de European Collection of Authenticated Cell Cultures (Sigma-Aldrich, USA).

3.7. Criterios de selección

3.7.1. Criterios de inclusión

Línea celular SH-SY5Y

Las células deben tener igual número de pases (< a 15)

Células sin contaminación microbiológica

3.7.2. Criterios de exclusión

Los cultivos de células que tienen distintos números de pases

Células con contaminación microbiológica

3.8. Instrumento de recolección de datos

Fichas de recolección de datos elaboradas por el tesista, Lector de ELISA, Software OriginPro 9.0, GraphPad Prism 6.0, Lector de microplacas fluorescentes.

3.9. Procesamiento de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey con un nivel de confianza de $p < 0,05$, usando el software estadístico GraphPad Prism versión 8.0.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Viabilidad celular.

Se utilizó el ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular. Las células endoteliales EA.hy926 se expusieron al fungicida ipconazole a concentraciones de (1, 5, 10, 20, 50 y 100 µM) durante 24 horas, mostrando un efecto reductor significativo (***p < 0,001) sobre la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis (Figura 1). Los resultados muestran que la viabilidad celular se redujo en un 20%, 78% y 87% por efecto del ipconazol a las dosis de 20, 50 y 100 µM, respectivamente, en comparación con el vehiculo. También se determinó que el valor de la concentracion inhibitoria media (IC_{50}) era de 29 µM.

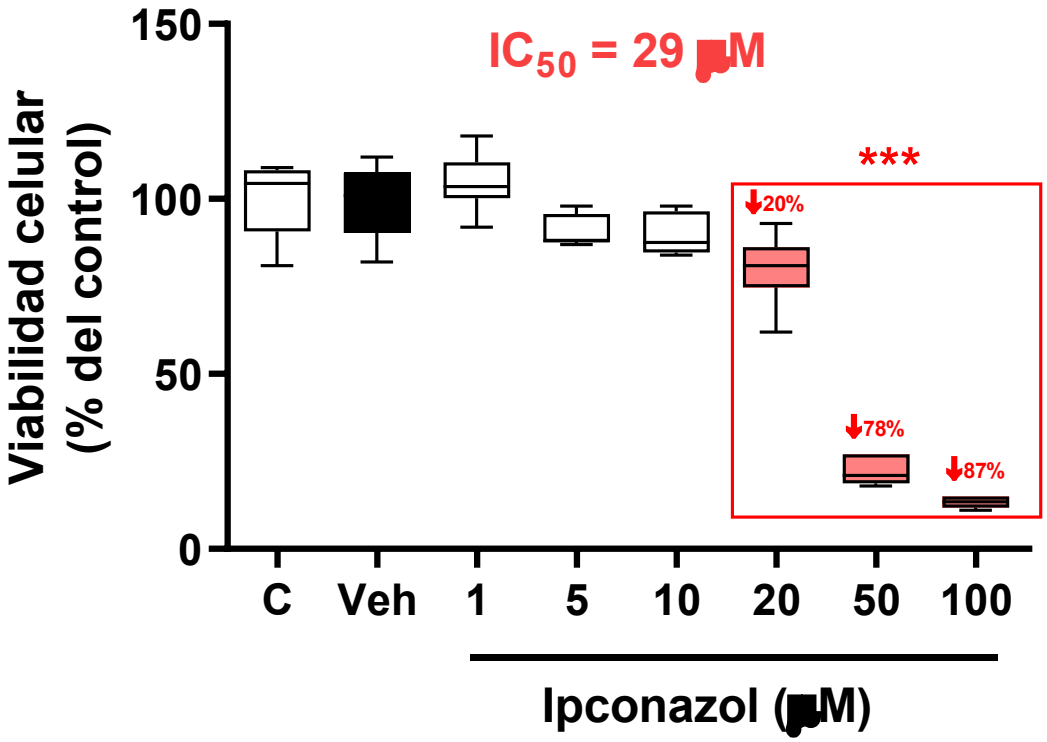


Figura 7. Reducción de la viabilidad celular producida por el fungicida ipconazol.

Dosis de 20, 50 y 100 µM de ipconazol produjeron una reducción representativa, dependiente de la dosis, de la viabilidad celular de EA.hy926 tras un periodo de exposición de 24 h. Los datos se presentan como % de control y como media ± DE de seis réplicas. Las concentraciones de ipconazol (barras rojas) muestran diferencias significativas (****p* < 0,001) en comparación con el vehículo (Veh, barra negra).

Generación de ROS.

Se expusieron las células endoteliales EA.hy926 al fungicida ipconazol durante 24 h para evaluar si este compuesto era capaz de generar alteraciones oxidativas, lo que se midió mediante la generación intracelular de ROS. Se observó que el ipconazol aumentó significativamente (**$p < 0,01$) los niveles de generación de ROS a dosis de 20 (15%), 50 (30%) y 100 (85%) µM, lo que refleja que actuó como sustancia prooxidante (Figura 2).

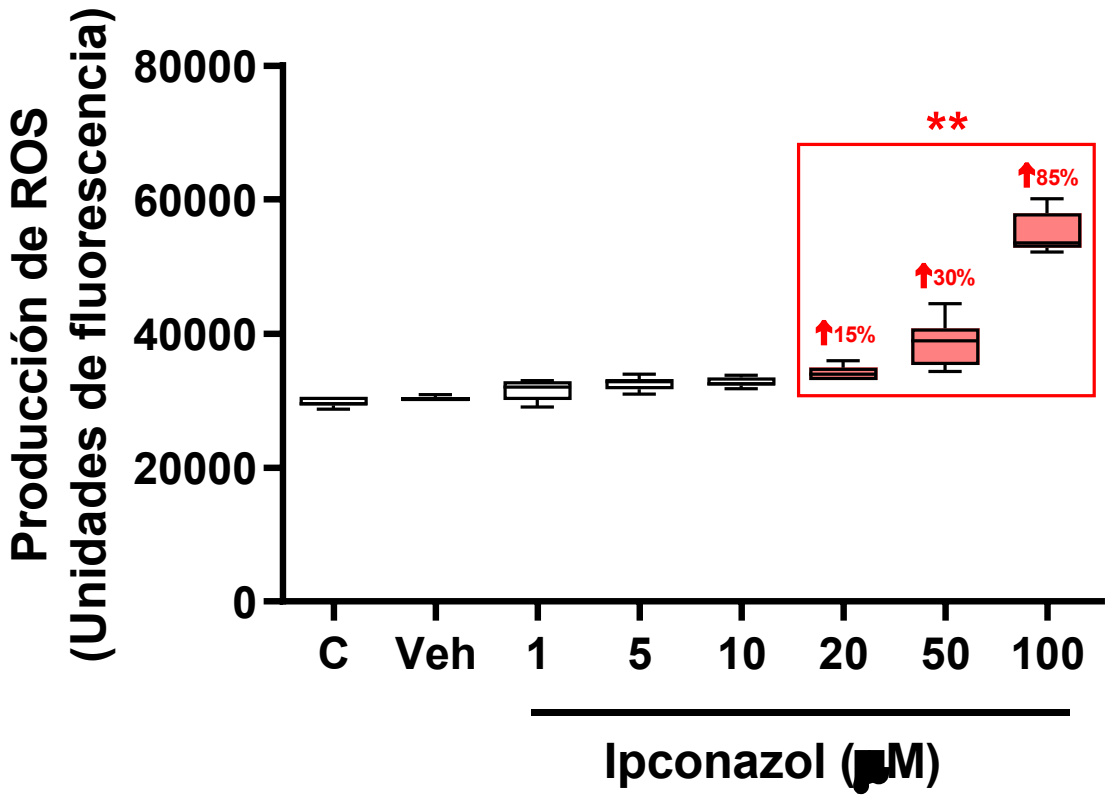


Figura 8. Generación de ROS inducida por el fungicida ipconazol. Dosis de 20, 50 y 100 µM de ipconazol aumentaron significativamente la generación de ROS en células EA.hy926 tras un periodo de exposición de 24 h. Los datos se presentan como % de control y media ± DE de seis réplicas. Las concentraciones de ipconazol (barras rojas) presentan diferencias significativas (**$p < 0,01$) en comparación con el vehículo (Veh, barra negra).

Actividad de la caspasa 3/7.

La muerte celular es un acontecimiento intracelular que implica la activación de varias moléculas proapoptóticas como las caspasas. En la presente investigación, se analizo la

actividad de la enzima caspasa 3/7 como indicador de muerte celular en células EA.hy926 expuestas al fungicida ipconazol. Se observó que el ipconazol era capaz de inducir de forma significativa (**$p < 0,01$) la actividad de la enzima caspasa 3/7 a dosis de 50 y 100 µM en un 18% y 38%, respectivamente (Figura 3).

Tras observar que la viabilidad celular y la generación de ROS se alteraban a 20 µM de ipconazol, que la caspase 3/7 aumentaba a 50 µM y que el IC_{50} era de 29 µM, se decidió utilizar dos dosis de ipconazol, una por debajo (20 µM) y otra por encima (50 µM) del IC_{50} para los ensayos moleculares.

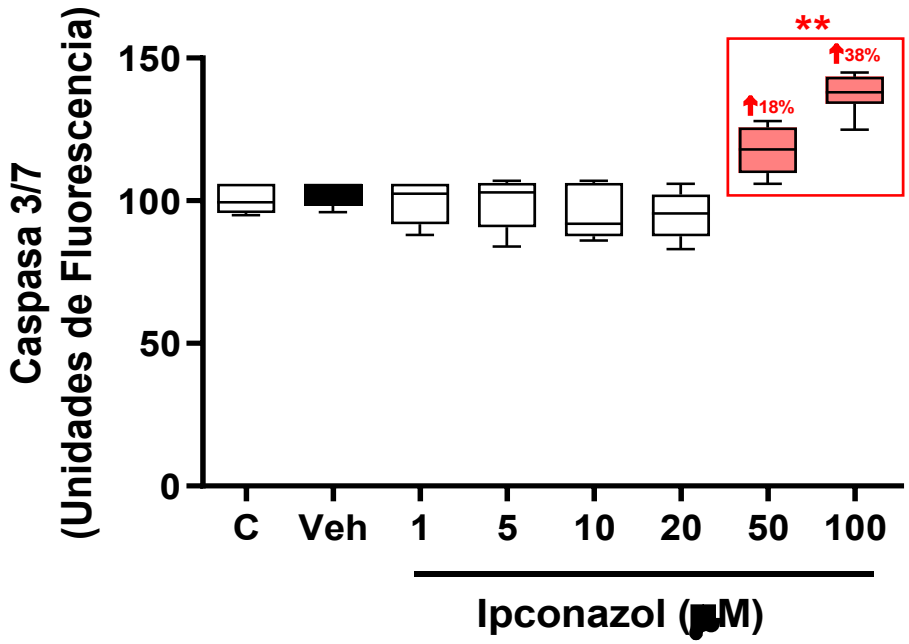


Figura 9. Actividad enzimática de la caspasa 3/7 por el fungicida ipconazol. Dosis de 50 y 100 µM de ipconazol aumentaron significativamente la actividad enzimática de la caspase 3/7 en células EA.hy926 tras un periodo de exposición de 24 horas. Los datos se presentan como % de control y media ± DE de seis réplicas. Las concentraciones de ipconazol (barras rojas) presentan diferencias significativas (**$p < 0,01$) en comparación con el vehículo (Veh, barra negra).

Biomarcadores de muerte celular.

Mediante análisis molecular qPCR, evaluamos si la expresión molecular de biomarcadores de muerte celular se veía alterada por el efecto del ipconazol en células EA.hy926. El ipconazol a concentraciones de 20 y 50 μM produjo un incremento significativo de la expresión molecular de BAX (1,39 y 1,73 veces, respectivamente) y CASP3 (1,66 y 2,24 veces, respectivamente). Además, sólo la dosis más alta de ipconazol (50 μM) aumentó la expresión molecular de APAF1 (2,66 veces), BNIP3 (2,08 veces) y AKT1 (2,42 veces), en comparación con el vehículo (Tabla 1). Sin embargo, el ipconazol a concentraciones de 20 y 50 μM reguló a la baja la expresión del gen *BCL2* en 0,13 y 0,16 veces, respectivamente. Estos datos sugieren un posible efecto apoptótico de la exposición al ipconazol en las células endoteliales EA.hy926 (Tabla 1). La figura 5 muestra el mapa de calor de la asociación directa o inversa entre los genes relacionados con la muerte celular que fueron regulados al alza o a la baja por el ipconazol.

Tabla 2. Expresión génica de biomarcadores moleculares relacionados con la muerte celular en células EA.hy926 tratadas con Ipconazol a 20 y 50 μM o DMSO (0,1%) como vehículo.

Gen	Control	Vehículo (DMSO)	Ipconazol	
			20 μM	50 μM
			Fold change	
BAX	1.00	0.99	**1.39****	**1.73*****
BCL2	1.00	0.97	**0.13*****	**0.16*****
APAF1	1.00	0.99	1.35	**2.66*****
BNIP3	1.00	1.02	1.08	**2.08*****
CASP3	1.00	1.00	**1.66***	**2.24*****
AKT1	1.00	1.02	1.27	**2.42*****
P53	1.00	0.92	0.95	1.04

Los datos de la expresión génica representan la media del fold-change. *p < 0,05, **p < 0,01 o ***p < 0,001 comparado con Veh de tres experimentos independientes. La letra roja representa una regulación al alza y la verde una regulación a la baja.

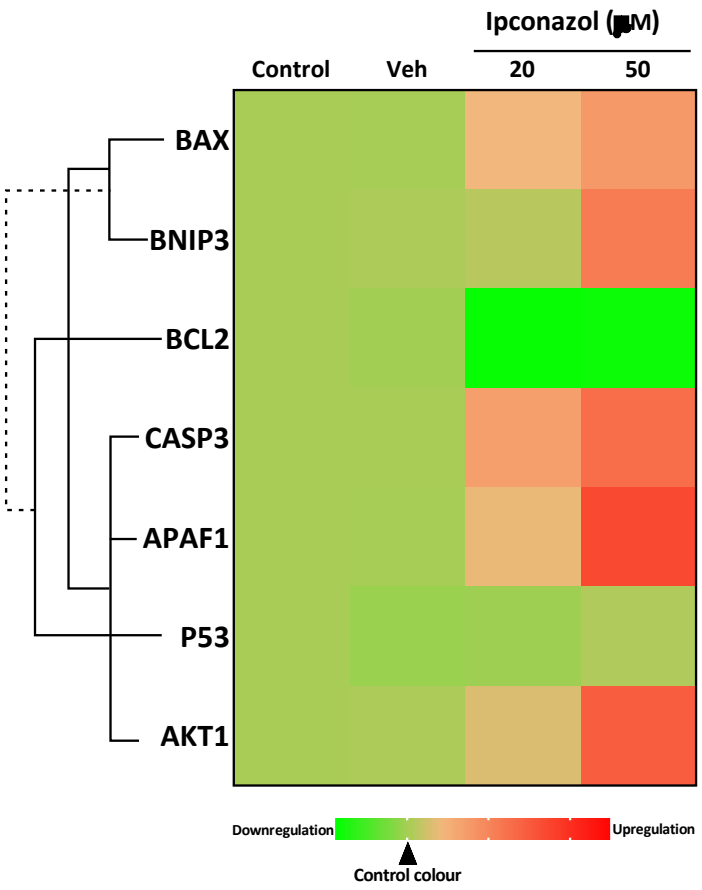


Figura 10. Mapa de calor de la asociación entre biomarcadores relacionados con la muerte celular (BAX, BNIP3, BCL2, APAF1, P53 y AKT1) en células EA.hy926 tras 24 h de exposición a ipconazol (20 y 50 µM). La escala de color verde representa la regulación a la baja y la escala de color rojo representa la regulación a la alta en relación con el vehículo (0,1% DMSO). La línea continua representa una asociación directa y la línea discontinua una asociación inversa.

Complejo inflamasoma.

En este estudio se evaluó mediante qPCR la expresión génica de moléculas implicadas en la activación, formación y respuesta del complejo inflamasoma. En células endoteliales EA.hy926 expuestas a ipconazol durante 24 h, se observó que a dosis de 20 y 50 µM se producía un incremento significativo de la expresión molecular de IL1β en 2,14 y 2,41 veces, respectivamente, en comparación con el vehículo. Además, sólo la dosis más alta de ipconazol (50 µM) produjo un incremento de la expresión molecular de NLRP3 (1,59 veces), CASP1 (2,07 veces), NFκB (2,31 veces), IL6 (3,34 veces) y TNFα (1,56 veces), en comparación con el vehículo (Tabla 3). La figura 6 muestra el mapa de calor de la asociación directa entre los genes relacionados con el complejo del inflamasoma que fueron regulados al alza por el ipconazol.

Tabla 2. Expresión génica de biomarcadores moleculares relacionados con el complejo inflamasoma en células EA.hy926 tratadas con Ipconazol a 20 y 50 uM o DMSO (0,1%) como control portador.

Gen	Control	Vehículo (Veh)	Ipconazol	
			20 μM	50 μM
			Fold change	
NLRP3	1.00	0.97	1.52	**1.59***
CASP1	1.00	1.01	0.96	**2.07*****
IL1β	1.00	0.97	**2.14****	**2.41****
NFκB	1.00	1.02	1.76	**2.31****
IL6	1.00	0.96	1.37	**3.34*****
TNFα	1.00	1.00	1.30	**1.56***

Los datos de expresión génica muestran la media de cambios en pliegues. *p < 0,05, **p < 0,01 o ***p < 0,001 en comparación con el vehículo, de tres experimentos independientes. La letra roja representa una regulación al alza.

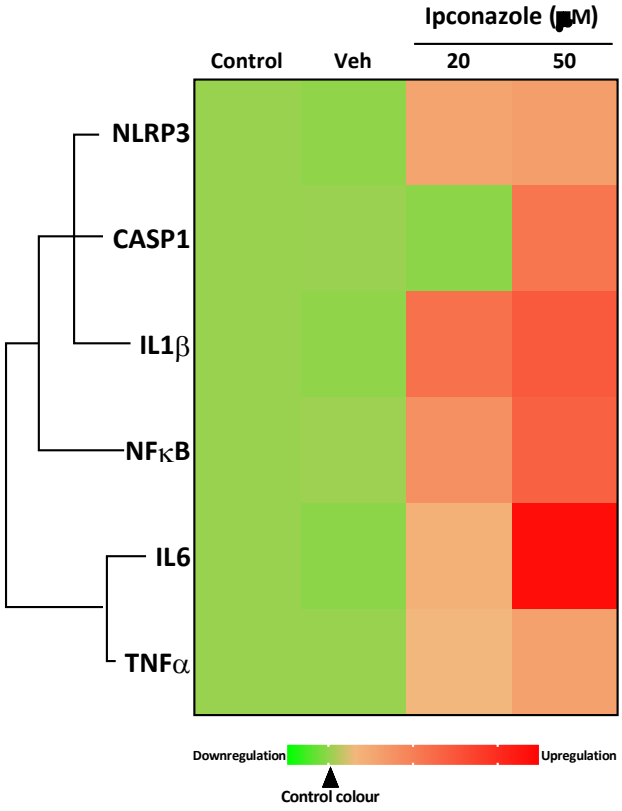


Figura 11. Mapa de calor de la asociación entre biomarcadores relacionados con el complejo inflamasoma (NLRP3, CASP1, IL1β, NFκB, IL6 y TNFα) en células EA.hy926 tras 24 h de exposición a ipconazol (20 y 50 μM). La escala de color verde representa la regulación a la baja, y la escala de color rojo representa la regulación al alza en relación con el vehículo (0,1% DMSO). La línea continua es una asociación directa.

Biomarcadores moleculares de antioxidantes.

La importancia de estudiar la expresión molecular de los antioxidantes radica en que estas moléculas pueden mantener o restaurar la homeostasis que puede estar alterada debido a un desafío celular. En el presente estudio, se visualizo que el ipconazol (50 µM) genero una disminución significativa de la expresión de NRF2 (0,56 veces) y GPx (0,45 veces) en comparación con el vehículo. La figura 7 muestra el mapa de calor de la asociación directa entre los genes relacionados con antioxidantes que fueron regulados al alza por el ipconazol.

Tabla 3. Expresión génica de biomarcadores moleculares relacionados con antioxidantes en células EA.hy926 tratadas con Ipconazol a 20 y 50 uM o DMSO (0,1%) como control portador.

Gen	Control	Vehículo (Veh)	Ipconazol	
			20 µM	50 µM
			Fold change	
NRF2	1.00	0.98	0.98	**0.56****
SOD	1.00	1.06	0.92	0.90
GPx	1.00	0.97	0.97	**0.45*****

Los datos de expresión génica muestran la media de cambios en pliegues. **p < 0,01 o ***p < 0,001 en comparación con el vehículo, de tres experimentos independientes. La letra verde representa la regulación a la baja.

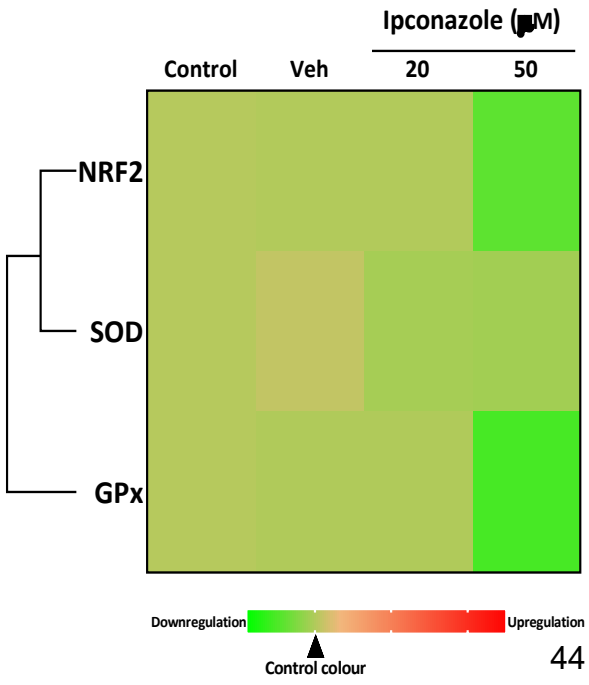


Figura 12. Mapa de calor de la asociación entre biomarcadores antioxidantes (NRF2, SOD y GPx) en células EA.hy926 tras 24 h de exposición a ipconazol (20 y 50 µM). La escala de color verde representa la regulación a la baja y la escala de color rojo representa la regulación al alza en relación con el vehículo (0,1% DMSO). La línea continua representa una asociación directa.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

El plaguicida ipconazol es uno de los fungicidas triazólicos más utilizados en la agricultura para proteger los cultivos de diversas enfermedades fúngicas. El abuso de fungicidas como el ipconazol es un problema para la salud humana, animal y vegetal debido a su uso generalizado en diversos productos agrícolas [2].

El presente estudio evaluó los efectos citotóxicos del fungicida ipconazol a diferentes concentraciones (1-100 μM) en la línea celular endotelial EA.hy926, mostrando que el ipconazol (IC50 = 29 μM) redujo la viabilidad celular de las células EA. hy926 de forma dosis-dependiente, este efecto citotóxico también se observó para otros fungicidas en diversos cultivos celulares [146-152], como en el caso del tebuconazol (IC_{50} = 60 μM) que produjo citotoxicidad en cardiomiocitos y células H9c2 [10], y cuando el tebuconazol se utilizó a dosis de 0-160 μM también indujo citotoxicidad dosis-dependiente en células HepG2 y HepaRG [146]. En otros estudios, se utilizó epoxiconazol (10-60 μM) para evaluar la citotoxicidad que podía generar en células neuronales de rata y se demostró que inhibía significativamente la viabilidad celular tras 24 h de tratamiento [147]; cuando se expuso epoxiconazol (IC50 = 50 μM) a células F98, la viabilidad disminuyó y la morfología celular se alteró [148]; y en linfocitos bovinos, se demostró que el epoxiconazol disminuía ligeramente la viabilidad celular con hasta un 70 % de células sometidas a apoptosis en la dosis más alta (15 μg mL-1) [149]. En células neuronales SH-SY5Y expuestas a propiconazol durante 4 h, se visualizo una reducción significativa de la viabilidad celular en relación con el control a 200 μM, y a las 24 h y 48 h hubo una reducción significativa de la viabilidad celular a concentraciones de 100 y 200 μM [150]; mientras que en las líneas celulares Hepa1c1c7 y HepG2 expuestas a propiconazol durante 24 h, se observó una viabilidad del 50 % para las células Hepa1c1c7 a 85. 4 μM, y para las células HepG2 fue de 148,4 μM [151]. En un ensayo con células madre embrionarias neurales murinas, el ciproconazol afectó a la viabilidad celular de forma dosis dependiente, produciendo un IC_{20} de 117,6 μM [152]. El presente estudio y los mencionados en esta sección soportan la actividad citotóxica de los fungicidas triazoles como potenciales contaminantes ambientales a considerar como factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades crónicas en humanos.

Numerosas condiciones intrínsecas o extrínsecas a la actividad celular, como la exposición a contaminantes pesticidas, afectan la homeostasis celular induciendo una alteracion del status oxidativo predominantemente gobernada por ROS, que promoverá el daño celular basados en la alteracion de biomoléculas como pro-teínas, lípidos y ácidos nucleicos [18,19,153]. Por otro lado, para evitar los efectos deletéreos que puede causar el exceso de producción de ROS, la defensa antioxidante generada por mediadores (NRF2) y enzimas antioxidantes (SOD, GPx y otros) es una respuesta eficiente al desequilibrio oxidativo celular [154-156]. NRF2 es un factor de transcripción que modera la acción antioxidante celular estimulando la transcripción del ARNm de enzimas antioxidantes que reducirán la producción de ROS. La enzima SOD acelera la reacción del anión superóxido (O_2) para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno (2O2--+2H+→H2O2+O2), controlando los niveles de anion superoxidos (O2), también controla la formación de ROS [155]. Mientras que la GPx permite la formación de agua a partir de H_2O_2, de ahí la importancia de encontrar ambas enzimas antioxidantes en compartimentos subcelulares para mantener la homeostasis oxidativa [156]. La presente investigación evalua el efecto del ipconazol sobre la generación de ROS por fluorescencia y la expresión molecular de ARNm de los biomarcadores antioxidantes NRF2, SOD y GPx en la línea celular EA.hy926. Los resultados indican que el ipconazol en concentraciones por encima de 20 µM induce la generación de ROS de forma dependiente de la dosis, mientras que la expresión de ARNm de NRF2 y GPx se regula a la baja. Con respect a otros estudios que relacionan el estrés oxidativo con los efectos fungicidas han demostrado que el epoxiconazol indujo significativamente la generación de ROS en células PC12 a concentraciones de 5, 10 y 20 µM [157], en células madre nerviosas a concentraciones de 2, 5 y 10 µM [147], en células nerviosas F98 a una concentración de 50 µM [158], y en células HCT116 a concentraciones de 10, 20 y 30 µM [159]; penconazol a 1 y 2 mg/L aumentó significativamente la producción de ROS en el pez cebra [160]; tebuconazol indujo un aumento significativo de anion de superoxido (O_2) en células H9c2 a concentraciones de 30 y 60 µM [10] y en células de carcinoma de colon humano HCT116 a 25 y 50 µM [161]; propiconazol aumentó los niveles de ROS en hepatocitos de hígado de ratón AML12 de 25 a 100 µM [162]; flusilazol e imazalil indujeron la producción de ROS, aunque sólo tras la exposición a 100 µM en células PC12 [14]; y ciproconazol, flusilazol, hexaconazol, procloraz y tebuconazol a 10 µM produjeron aumentos significativos de ROS

en células de Leydig murinas (MA-10) y células T47D-ARE humanas [163]. Estos resultados *in vitro* demuestran que los fungicidas triazoles pueden impulsar la generación de ROS en varios tipos de células.

En resumen, la principal respuesta al estrés oxidativo es la actividad de moléculas antioxidantes como NRF2, SOD, GPx y otras. En este estudio, los mediadores antioxidantes (NRF2 y GPx) fueron regulados a la baja en células EA.hy926 por ipconazol (20 y 50 μM). También se ha observado una respuesta similar con epoxiconazol (56 mg/kg), que redujo las actividades de las enzimas antioxidantes catalasa, GPx y glutatión transferasa en células de riñón e hígado de rata [148]; sin embargo, otros estudios indican que los fungicidas triazoles son capaces de aumentar la respuesta antioxidante tras un desafío oxidativo [158,164].

La muerte celular programada, comúnmente conocida como apoptosis, es un proceso celular altamente regulado y controlado en el que las células afectadas en su homeostasis por un agente exógeno o por un producto de su metabolismo son eliminadas de un tejido. La apoptosis está mediada por caspasas iniciadoras y efectoras que inducen los diversos procesos implicados en la destrucción celular. Estos procesos incluyen la fragmentación del ADN por la ADNasa, la condensación de la cromatina y la ruptura de la membrana por la actomiosina, que genera cuerpos apoptóticos [11-14]. La vía mitocondrial de la apoptosis, regulada por la familia BCL-2, se induce cuando sus componentes anti-apoptóticos son neutralizados por las proteínas BH3, BAK y BAX, conduciendo a la ruptura de la membrana mitocondrial externa e induciendo su permeabilización, desencadena finalmente la activación de la caspasa iniciadora 9 y las caspasas efectoras 3 y 7 [15-19]; nuestro estudio se determino que el fungicida ipconazol tenía la capacidad de incrementar la actividad de la enzima caspasa 3/7, y la expresión molecular de bi-marcadores asociados con la activación de la muerte celular BAX, BNIP3, APAF1, AKT1 y CASP3. Otros estudios *in vitro* e *in vivo* confirman la capacidad de los fungicidas para aumentar la actividad de las enzimas caspasas. El epoxiconazol fue capaz de inducir la actividad de la caspasa 3 en células de glioma F98 a concentración del rango 12-50 μM [148,158], en células PC12 a una concentración de 5-20 μM [157], en células madre nerviosas a una concentración de 2-10 μM [147], y en tres líneas celulares humanas (HepG2, HEK293 y JEG3) se indujo la caspasa3/7 a una concentración

de 125 g/L [165]; el tebuconazol aumentó la activación de la caspase 9 y la caspase 3 en células miocárdicas a dosis de 0 9, 9 y 27 mg/kg b. w. [166], en células epiteliales de glándula mamaria bovina a 100-200 μM [167], en células HCT116 a dosis crecientes de 12. 5, 25, 50 y 75 μM [168], en células cardiacas a dosis de 30 y 60 μM [10]; asi mismo, aumentó la actividad de la caspasa 3/7 en tres líneas celulares humanas (HepG2, HEK293 y JEG3) a una concentración de 50 ppm [165], y en células de rata se indujo la caspasa 3/7 a 175-200 μg/L [169]; y el pro-piconazol en el pez cebra aumentó la actividad de la caspasa 3/7 en 1 μg/L [170]. Estas investigaciones y la del presente estudio como el nuestro también han encontrado que los fungicidas triazoles son capaces de variar la expresión génica de los biomarcadores de muerte celular *BAX, BCL2, BNIP3, APAF1 y AKT1* [160,167,171-174].

El inflamasoma NLRP3 es un complejo proteico multimérico que se ensambla en el citosol y sirve de andamio para reclutar el zimógeno inactivo pro-caspasa 1, que se activa a caspasa-1 tras la oligomerización. La caspase 1 es una enzima que escinde las citocinas precursoras pro-IL1β y pro-IL18 a sus formas biológicas activas IL1β e IL18 y también puede inducir la piroptosis [175]. Además, la IL-1β podría inducir la expresión de TNFα y la secreción de IL6, lo que podría desencadenar un aumento de la respuesta inflamatoria celular [176-177]. Por otra parte, se ha propuesto que NFκB, el regulador maestro de la inflamación, que no forma parte del complejo inflamasoma, podría aumentar la producción génica de NLRP3 y sus mediadores proinflamatorios [178]. En nuestro estudio, determinamos que los componentes del complejo inflamasoma (NLRP3, CASP1 e IL1β) y los biomarcadores proinflamatorios (NFκB, IL6 y TNFα) estaban regulados al alza en las células EA.hy926 expuestas a ipconazol, con una asociación significativa entre ellos. Varios estudios *in vitro* con pesticidas mostraron que el complejo inflammasoma NLRP3 esta sobreexpresado y que los componentes inflamatorios muestras aumentos significativos tras la exposición a pesticidas como rotenona, piretroides, paraquat, clorpirifos [18,19,179-182]. Este estudio proporciona algunos de los posibles eventos celulares asociados con la muerte celular, el estrés oxidativo y la inflamación que pueden verse alterados en las células EA.hy926 como resultado de la exposición al fungicida ipconazol.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- El presente estudio demuestra, en células endoteliales EA.hy926 expuestas al fungicida ipconazol, una reducción dosis-dependiente de la viabilidad celular, resultados confirmados por el incremento de la actividad de la enzima caspasa 3/7 y la expresión molecular de los biomarcadores de muerte celular BAX, APAF1, BNIP3, CASP3 y AKT1.

- También proponemos que este efecto citotóxico podría deberse a que ipconazol indujo estrés oxidativo al aumentar la generación de ROS y disminuir la expresión molecular de NRF2 y GPx; así como la inducción de los mediadores proinflamatorios NLRP3, CASP1, IL1β, NFκB, IL6 y TNFα.

- El estrés oxidativo, la actividad proinflamatoria y la inducción de la muerte celular son mecanismos clave que explican el efecto citotóxico del fungicida ipconazol. Por tanto, este compuesto triazol debe ser considerado un factor de riesgo potencial en la alteración de la homeostasis celular, lo que resalta la importancia de evaluar sus efectos tóxicos en contextos de exposición ambiental y ocupacional.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. European Food Safety Authority (EFSA). (2022). Statement concerning the review of the approval of the ac-tive substance ipconazole. European Food Safety Authority Journal, 20;8. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7133.
2. USEPA. Pesticides - Fact Sheet for Ipconazole. 2004, 1-17
3. Usman, M.; Farooq, M.; Wakeel, A.; Nawaz, A.; Cheema, S.A.; Rehman, H.U.; Ashraf, I.; Sanaullah, M. Nan-otechnology in agriculture. Current status. challenges and future opportunities. Science and total environment.2020,721. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778.
4. Liu, T.; Fang, K.; Liu, Y.; Zhang, X.; Han, L.; Wang, X. Enantioselective residues and toxicity effects of the chiral triazole fungicide hexaconazole in earthworms (Eisenia fetida). Environmental Pollution. 2021;270. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116269.
5. Roman, D.L.; Voiculescu, D.I.; Filip, M.; Ostafe, V.; Isvoran, A. Effects of Triazole Fungicides on Soil Micro-biota and on the Activities of Enzymes Found in Soil. A Review. Agriculture. 2021;11. https://doi.org/10.3390/agriculture11090893.
6. Teysseire, R.; Manangama, G.; Baldi, I.; Carles, C.; Brochard, P.; Bedos, C.; Delva, F. Determinants of non-dietary exposure to agricultural pesticides in populations living close to fields. A systematic review. .Science and total environment. 2021,761. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143294.
7. Zhang, H.; Qian, M.; Wang, J.; Yang, G.; Weng, Y.; Jin, C.; Li, Y.; Jin, Y. Insights into the effects of difenocon-azole on the livers in male mice at the biochemical and transcriptomic levels. Journal of hazardous materials. 2022;422. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126933.
8. Wang, X.; Ni, H.; Xu, W.; Wu, B.; Xie, T.; Zhang, C.; Cheng, J.; Li, Z.; Tao, L.; Zhang. Difenoconazole induces oxidative DNA damage and mitochondria mediated apoptosis in SH-SY5Y cells. Chemosphere. 2021,283. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131160.
9. Sanchez, C.L.; Souders, C.L.; Pena-Delgado, C.J.; Nguyen, K.T.; Kroyter, N.; Ahmadie, N.E.; Aristiza-bal-Henao, J.J.; Bowden, J.A.; Martyniuk, C.J. Neurotoxicity assessment of triazole fungicides on mitochon-drial oxidative respiration and lipids in differentiated

human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Neurotoxicology. 2020,80,76–86. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.06.009.

10. Ben Othmène, Y.; Monceaux, K.; Karoui, A.; Ben Salem, I.; Belhadef, A.; Abid-Essefi, S.; Lemaire, C. Tebu-conazole induces ROS-dependent cardiac cell toxicity by activating DNA damage and mitochondrial apoptotic pathway. Ecotoxicology and environmental Safety. 2020,204. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111040.
11. Pan, J.S.; Hong, M.Z.; Ren, J.L. Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. World journal of gastroenterology. 2009, 15 (14); 1702–1707. https://doi.org/10.3748/wjg.15.1702.
12. Ferreira, D.; da Motta, A.C.; Kreutz, L.C.; Toni, C.; Loro, V.L.; Barcellos, L.J. Assessment of oxidative stress in Rhamdia quelen exposed to agrichemicals. Chemosphere. 2010,79, 9, 914–921. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.024.
13. Chaâbane, M.; Koubaa, M.; Soudani, N.; Elwej, A.; Grati, M.; Jamoussi, K.; Boudawara, T.; Ellouze Chaabouni, S.; Zeghal, N. Nitraria retusa fruit prevents pen-conazole-induced kidney injury in adult rats through modulation of oxidative stress and histopathological changes. Pharmaceutical Biology.2017,55,1,1061–1073. https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1278455.
14. Heusinkveld, H.J.; Molendijk, J.; Van Den Berg, M.; Westerink, R.H. Azole fungicides disturb intracellular Ca2+ in an additive manner in dopaminergic PC12 cells. Toxicological sciences. An official journal of the Society of Toxicology. 2013,134. https://doi.org/10.1093/toxsci/kft119.
15. Chen, L.; Teng, H.; Zhang, K.Y.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M.I.; Xiao, J. Agrimonolide and Desmethylagrimonolide Induced HO-1 Expression in HepG2 Cells through Nrf2-Transduction and p38 In-activation. Frontiers in pharmacology. 2017,7, 513. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00513.
16. Soudani, N.; Ben Amara, I.; Sefi, M.; Boudawara, T.; Zeghal, N. Effects of sele-nium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. Experimental and toxi-cologic pathology. Official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie. 2011,63, 6, 541–548. https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.04.005.

17. Yang, J.D.; Liu, S.H.; Liao, M.H.; Chen, R.M.; Liu, P.Y.; Ueng, T.H. Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. Environmental toxicology. 2018,33. https://doi.org/10.1002/tox.22575.
18. Castillo, G.; Barrios-Arpi, L.; Ramos-Gonzalez, M.; Vidal, P.; Gonzales-Irribarren, A.; Ramos-Cevallos, N.; Rodríguez, J.L. Neurotoxicity associated with oxidative stress and inflammasome gene expression induced by allethrin in SH-SY5Y cells. Toxicology and Industrial Health. 2022,38,777-788.https://doi.org/10.1177/07482337221089585.

19. Barrios-Arpi, L.; Arias, Y.; Lopez-Torres, B.; Ramos-Gonzalez, M.; Ticli, G.; Prosperi, E.; Rodríguez, J.L. In Vitro Neurotoxicity of Flumethrin Pyrethroid on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Apoptosis Associated with Oxidative Stress. Toxics. 2022,10,3, 10030131. https://doi.org/10.3390/toxics10030131.
20. Bauernfeind, F.G.; Horvath, G.; Stutz, A.; Alnemri, E.S.; MacDonald, K.; Speert, D.; et al. Cutting edge: NF-kappa B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol. 2009, 183(2),787–791. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363.

21. Hata, A.N.; Engelman, J.A.; Faber, A.C. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Tar-geted Anticancer Therapeutics. Cancer discovery. 2015,5,5, 475–487. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0011.
22. Tait, S.W.; Green, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nature reviews. Molecular cell biology. 2010,11,9,621–632. https://doi.org/10.1038/nrm2952
23. Soliman AS, Helmy RMA, Nasr IN, Abbas MS, Mahmoud HA, Jiang W. Behavior of Thiophanate Methyl and Propiconazole in Grape and Mango Fruits Under the Egyptian Field Conditions. Bull Environ Contam Toxicol. 2017,98,720–5. https://doi.org/10.1007/s00128-017-2066-x
24. Xu J, Xiong H, Zhang X, Muhayimana S, Liu X, Xue Y, et al. Comparative cytotoxic effects of five commonly used triazole alcohol fungicides on human cells of different tissue types. Journal Environmental Science Health-Part B Pestic Food Contam Agric Wastes. 2020,5(55),438–46.https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1709377.

25. Zhang Z, Gao B, He Z, Li L, Shi H, Wang M. Enantioselective metabolism of four chiral triazole fungicides in rat liver microsomes. Chemosphere.2019,224,77–84. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.119.
26. Heusinkveld HJ, Molendijk J, Van den Berg M, Westerink RHS. Azole fungicides disturb intracellular Ca2+ in an additive manner in dopaminergic PC12 cells. Toxicological Sciences. 2013,2,134,374–81. https://doi.org/10.1093/toxsci/kft119.
27. Holečková B, Šiviková K, Dianovský J, Galdíková M. Effect of triazole pesticide formulation on bovine culture cells. Journal of Environmental Science and Health - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes.2013,12,48,1080–8.https://doi.org/10.1080/03601234.2013.824224.
28. Sanchez CL, Souders CL, Pena-Delgado CJ, Nguyen KT, Kroyter N, Ahmadie NE, et al. Neurotoxicity assessment of triazole fungicides on mitochondrial oxidative respiration and lipids in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Neurotoxicology. 2020,80,76–86. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.06.009.
29. Perdichizzi, S.; Mascolo, M. G.; Silingardi, P.; Morandi, E.; Rotondo, F.; Guerrini, A.; Prete, L.; Vaccari, M.; Colacci, A. Cancer-related genes transcriptionally induced by the fungicide penconazole. Toxicology in Vitro.2014,1,28,125–130. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.006.
30. Roelofs, M. J. E.; Temming, A. R.; Piersma, A. H.; van den Berg, M.; van Duursen, M. B. M. Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro.Toxicoly Reports. 2014,1,271–283. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.006.
31. Karacaoğlu E. Flusilazole Induced Cytotoxicity and Inhibition of Neuronal Growth in Differentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by All-Trans-Retinoic Acid (Atra). Turk J Pharm Sciences. 2021, 18,5, 597–603.https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.30676.
32. Lichtenstein, D.; Lasch, A.; Alarcan, J.; Mentz, A.; Kalinowski, J.; Schmidt, F. F.; Pötz, O.; Marx-Stoelting, P.; Braeuning, A. An eight-compound mixture but not corresponding concentrations of individual chemicals induces triglyceride accumulation in human liver cells. Toxicology. 2021,459.https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152857.
33. Ben Othmène, Y.; Monceaux, K.; Belhadef, A.; Karoui, A.; Ben Salem, I.; Boussabbeh, M.; Abid-Essefi, S.; Lemaire, C. Triazole fungicide tebuconazole induces apoptosis

through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. Environmental Toxicology Pharmacoly.2022,94.https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103919.

34. Kwon, H. C.; Kim, D. H.; Jeong, C. H.; Kim, Y. J.; Han, J. H.; Lim, S. J.; Shin, D. M.; Kim, D. W.; Han, S. G. Tebuconazole Fungicide Induces Lipid Accumulation and Oxidative Stress in HepG2 Cells. Foods. 2021, 10,10. https://doi.org/10.3390/foods10102242.
35. Zhou, J.; Zhang, J.; Li, F.; & Liu, J. Triazole fungicide tebuconazole disrupts human placental trophoblast cell functions. Journal of Hazardous Materials. 2016,308,294–302. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.055.
36. Ben Othmène, Y.; Monceaux, K.; Karoui, A.; Ben Salem, I.; Belhadef, A.; Abid-Essefi, S.; Lemaire, C. Tebuconazole induces ROS-dependent cardiac cell toxicity by activating DNA damage and mitochondrial apoptotic pathway. Ecotoxicoly and Environmental Safety. 2020,204. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111040.
37. Hamdi, H.; Rjiba-Touati, K.; Ayed-Boussema, I.; M'nassri, A.; Chaabani, H.; Rich, S.; Abid-Essefi, S. Epoxiconazole caused oxidative stress related DNA damage and apoptosis in PC12 rat Pheochromocytoma.Neurotoxicology.2022,89,184–190. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.02.003.
38. Le Corre, L.; Brulport, A.; Vaiman, D.; Chagnon, M. C. Epoxiconazole alters the histology and transcriptome of mouse liver in a transgenerational pattern. Chem Biological Interactions. 2022,360. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109952.
39. Villaorduña, C.; Mendoza-Carlos, M.; Chuyma, M.; Avilés, J.; Avalos-Diaz, A.; Lozano-Reategui, R.; Garcia-Ruiz, J.; Panduro-Tenazoa, N.; Vargas, J.; Moran-Quintanilla, Y.; et al. Ipconazole Induces Oxidative Stress, Cell Death, and Proinflammation in SH-SY5Y Cells. Toxics.2023,11.https://doi.org/10.3390/toxics11070566.
40. Zubrod, J. P.; Bundschuh, M.; Arts, G.; Brühl, C. A.; Imfeld, G.; Knäbel, A.; Payraudeau, S.; Rasmussen, J. J.; Rohr, J.; Scharmüller, A.; Smalling, K.; Stehle, S.; Schulz, R.; Schäfer, R. B. Fungicides: An Overlooked Pesticide Class?. Environmental Science Technology. 2019, 53,7, 3347–3365. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392.
41. Kahle, M.; Buerge, I. J.; Hauser, A.; Müller, M. D.; Poiger, T. Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. Environmental Science Technology. 2008, 42,19, 7193-7200. https://doi.org/10.1021/es8009309.

42. Giavini, E., Menegola, E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus?. Toxicoly letters. 2010,198,2,106-111. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.07.005.
43. Fisher, M. C.; Henk, D. A.; Briggs, C. J.; Brownstein, J. S.; Madoff, L. C.; McCraw, S. L.; Gurr, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature. 2012, 484,7393, 186-194.https://doi.org/10.1038/nature10947.
44. Strange, R. N.; Scott, P. R. Plant disease: a threat to global food security. Annu Rev Annual review of Phytopathol.2005,43,83-116. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839
45. Nocua-Báez LC, Uribe-Jerez P, Tarazona-Guaranga L, Robles R, Cortés JA. Azoles de antes y ahora: una revisión. Revista Chilena de infectología. 2020;37,3,219–30. http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182020000300219.
46. Zhang, Z.; Jiang, W.; Jian, Q.; Song, W.; Zheng, Z.; Wang, D.; Liu, X. Residues and dissipation kinetics of triazole fungicides difenoconazole and propiconazole in wheat and soil in Chinese fields. Food Chemistry.2015,168,396–403. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.087.
47. Wang, C.; Wang, Y.; Wang, R.; Yan, J.; Lv, Y.; Li, A. Dissipation kinetics, residues and risk assessment of propiconazole and azoxystrobin in ginseng and soil. International Journal of Environmental Analytical Chemistry.2017,97,1-13. https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1272678.
48. Cheng, Y.; Zheng, Y.; Dong, F.; Li, J.; Zhang, Y.; Sun, S.; Li, N.; Cui, X.; Wang, Y.; Pan, X.; Zhang, W. Stereoselective Analysis and Dissipation of Propiconazole in Wheat, Grapes, and Soil by Supercritical Fluid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Agricultural Food Chemistry. 2017, 65,1, 234–243. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04623.
49. Soliman, A. S.; Helmy, R. M.; Nasr, I. N.; Abbas, M. S.; Mahmoud, H. A.; Jiang, W. Behavior of Thiophanate Methyl and Propiconazole in Grape and Mango Fruits Under the Egyptian Field Conditions. Bull Environ Toxicol. 2017, 98,5, 720–725.https:// 98. 10.1007/s00128-017-2066-x.
50. Vieira, M. L.; Costa, N. O.; Pereira, M. R. F.; de Fátima Paccola Mesquita, S.; Moreira, E. G.; Gerardin, D. C. C. Chronic exposure to the fungicide propiconazole: Behavioral

and reproductive evaluation of F1 and F2 generations of male rats. Toxicology. 2017,389, 85–93. https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.012.

51. Sun, G.; Thai, S. F.; Tully, D. B.; Lambert, G. R.; Goetz, A. K.; Wolf, D. C.; Dix, D. J.; Nesnow, S. Propiconazole-induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver. Toxicology Letters. 2005, 155,2, 277–287. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.10.006.
52. Valadas, J.; Mocelin, R.; Sachett, A.; Marcon, M.; Zanette, R. A.; Dallegrave, E.; Herrmann, A. P. Propiconazole induces abnormal behavior and oxidative stress in zebrafish. Environmental Science Pollution Research.2019, 26,27, 27808–27815. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05977-3.
53. Teng, M.; Chen, X.; Wang, C.; Song, M.; Zhang, J.; Bi, S.; Wang, C. Life cycle exposure to propiconazole reduces fecundity by disrupting the steroidogenic pathway and altering DNA methylation in zebrafish (Danio rerio). Environment International.2020,135, 105384. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105384.
54. Teng, M.; Zhao, W.; Chen, X.; Wang, C.; Zhou, L.; Wang, C.; Xu, Y. Parental exposure to propiconazole at environmentally relevant concentrations induces thyroid and metabolism disruption in zebrafish (Danio rerio) offspring: An in vivo, in silico and in vitro study. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2022,242,113865. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113865.
55. Souders, C. L.; 2nd, Xavier, P.; Perez-Rodriguez, V.; Ector, N.; Zhang, J. L.; Martyniuk, C. J. Sub-lethal effects of the triazole fungicide propiconazole on zebrafish (Danio rerio) development, oxidative respiration, and larval locomotor activity. Neurotoxicoly and Teratology. 2019, 74, 106809.https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.106809.
56. Chen, L.; Wang, Z.; Zhang, C.; Jiang, W.; Li, X. Environmental Hormone Effects and Bioaccumulation of Propiconazole and Difenoconazole in Procypris merus. Environmental Contamination and Toxicoly. 2022, 109,5, 823–830.https://doi.org/10.1007/s00128-022-03609-0.
57. Kwon, H. C.; Sohn, H.; Kim, D. H.; Shin, D. M.; Jeong, C. H.; Chang, Y. H.; Yune, J. H.; Kim, Y. J.; Kim, D. W.; Kim, S. H.; Han, S. G. In Vitro and In Vivo Study on the Toxic Effects of Propiconazole Fungicide in the Pathogenesis of Liver Fibrosis. Agricultural Food Chemistry. 2021, 69,26, 7399–7408. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01086.

58. ECHA. Annex VI report, Proposal for Harmonised Classification and Labelling. echa.europa.eu. 2009, Annex VI, 1-49.
59. Chaâbane, M.; Elwej, A.; Ghorbel, I.; Chelly, S.; Mnif, H.; Boudawara, T.; Ellouze Chaabouni, S.; Zeghal, N.; Soudani, N. Penconazole alters redox status, cholinergic function and lung's histoarchitecture of adult rats: Reversal effect of vitamin E. BiomedicinePharmacotherapy.2018,102,645652.https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.113.
60. Chaâbane, M.; Ghorbel, I.; Elwej, A.; Mnif, H.; Boudawara, T.; Chaâbouni, S. E.; Zeghal, N.; Soudani, N. Penconazole alters redox status, cholinergic function, and membrane-bound ATPases in the cerebrum and cerebellum of adult rats. Human Experimental Toxicology. 2017, 36,8, 854–866.https://doi.org/10.1177/0960327116672911.
61. Meng, Z.; Liu, L.; Jia, M.; Li, R.; Yan, S.; Tian, S.; Sun, W.; Zhou, Z.; Zhu, W. Impacts of Penconazole and Its Enantiomers Exposure on Gut Microbiota and Metabolic Profiles in Mice. Agriculture Food Chem.2019,67,30,8303–8311. Https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02856.
62. El-Shershaby, A. E. M.; Lashein, F. E. M.; Seleem, A. A.; Ahmed, A. A. Developmental neurotoxicity after penconazole exposure at embryo pre- and post-implantation in mice. Histotechnology. 2020, 43,3, 135–146.https://doi.org/10.1080/01478885.2020.1747214.
63. Jia, M.; Teng, M.; Tian, S.; Yan, J.; Meng, Z.; Yan, S.; Li, R.; Zhou, Z.; Zhu, W. Effects of penconazole enantiomers exposure on hormonal disruption in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Environmental Science and Pollution Research. 2021, 28,32, 43476–43482. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13446-z.
64. Icoglu Aksakal, F.; Ciltas, A. Developmental toxicity of penconazole in Zebrfish (Danio rerio)embryos.Chemosphere.2018,(200),8–15.https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.094.
65. Jia, M.; Teng, M.; Tian, S.; Yan, J.; Meng, Z.; Yan, S.; Li, R.; Zhou, Z.; Zhu, W. Developmental toxicity and neurotoxicity of penconazole enantiomers exposure on zebrafish (*Danio rerio*).Environmental Pollution.2020,267,115450. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115450.
66. Mosiichuk, N.; Husak, V.; Storey, K. B.; Lushchak, V. Acute Exposure to the Penconazole-Containing Fungicide Topas Induces Metabolic Stress in Goldfish.

Chemical Research in Toxicology.2021,34,12,2441–2449. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00174.

67. Alkan Uçkun, A.; Barım Öz, Ö. Acute exposure to the fungicide penconazole affects some biochemical parameters in the crayfish (*Astacus leptodactylus Eschscholtz, 1823*). Environmental Science Pollution Research. 2020,27,28,35626–35637. https://doi.org/10.1007/s11356-020-09595-2.
68. Turhan, D. O.; Güngördü, A. Developmental, toxicological effects and recovery patterns in Xenopus laevis after exposure to penconazole-based fungicide during the metamorphosisprocess.Chemosphere.2022,303,3.https://doi.org/10.1016/j.chemosphere. 2022.135302.
69. European Food Safety Authority. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for flusilazole according to Article 12 of Regulation (EC)No396/2005.EFSAJournal.2013,11,4,3186.https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3186 .
70. Dimopoulou, M.; Verhoef, A.; van Ravenzwaay, B.; Rietjens, I. M.; Piersma, A. H. Flusilazole induces spatio-temporal expression patterns of retinoic acid-, differentiation- and sterol biosynthesis-related genes in the rat Whole Embryo Culture. Reproductive Toxicology. 2016,64,77–85.https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.003.
71. Menegola, E.; Broccia, M. L.; Di Renzo, F.; Giavini, E.Antifungal triazoles induce malformations *in vitro*.Reproductive Toxicology.2001,15,421–427. https://doi.org/10.1016/S0890-6238(01)00143-5.
72. Farag, A. T.; Ibrahim, H. H. Developmental toxic effects of antifungal flusilazole administered by gavage to mice. Birth Defects Research B: Developmental and Reproductive Toxicology. 2007, 80,1, 12–17.https://doi.org/10.1002/bdrb.20098.
73. Hermsen, S. A.; Pronk, T. E.; van den Brandhof, E. J.; van der Ven, L. T.; Piersma, A. H. Triazole-induced gene expression changes in the zebrafish embryo. Reproductive Toxicology.2012,34,2, 216–224. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.093.
74. Karacaoğlu E. Flusilazole-induced damage to SerW3 cells via cytotoxicity, oxidative stress and lipid metabolism: An in vitro study. Pesticide Biochemistry Physiology. 2022,180.https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104998.

75. European Food Safety Authority. Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for tebuconazole according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005.European Food Safety Authority.2014, 9,8, 2339.https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2339
76. Liu, X.; Wang, X.; Xu, J.; Dong, F.; Song, W.; Zheng, Y. Determination of tebuconazole, trifloxystrobin and its metabolite in fruit and vegetables by a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) method using gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector and ion trap mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2011, 25,10, 1081-1090. https://doi.org/10.1002/bmc.1575
77. Yang, L.; Yang, D.; Yan, X.; Cui, L.; Wang, Z.; Yuan, H. The role of gibberellins in improving the resistance of tebuconazole-coated maize seeds to chilling stress by microencapsulation. Sci Rep. 2016,6,35447.https://doi.org/10.1038/srep35447
78. Ben Othmène, Y.; Hamdi, H.; Annabi, E.; Amara, I.; Ben Salem, I.; Neffati, F.; Najjar, M. F.; Abid-Essefi, S. Tebuconazole induced cardiotoxicity in male adult rat. Food Chemical Toxicology. 2020,137,111134.https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111134
79. Ma, F.; Li, Y.; Yu, Y.; Li, Z.; Lin, L.; Chen, Q.; Xu, Q.; Pan, P.; Wang, Y.; Ge, R. S. Gestational exposure to tebuconazole affects the development of rat fetal Leydig cells. Chemosphere. 2021,262,127792.https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127792
80. Chen, X.; Zhu, Q.; Li, X.; Huang, T.; Wang, S.; Wang, Y.; Chen, X.; Lin, Z.; Ge, R. S. Pubertal exposure to tebuconazole increases testosterone production via inhibiting testicular aromatase activity in rats. Chemosphere. 2019,230, 519–526. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.122
81. Meng, Z.; Sun, W.; Liu, W.; Wang, Y.; Jia, M.; Tian, S.; Chen, X.; Zhu, W.; Zhou, Z. A common fungicide tebuconazole promotes colitis in mice via regulating gut microbiota. Environmental Pollution.2022,292,118477.https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118477.
82. Ku, T.; Liu, Y.; Xie, Y.; Hu, J.; Hou, Y.; Tan, X.; Ning, X.; Li, G.; Sang, N. Tebuconazole mediates cognitive impairment via the microbe-gut-brain axis (MGBA) in mice. Environmental International.2023,173,107821.https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107821.

83. Ku, T.; Zhou, M.; Hou, Y.; Xie, Y.; Li, G.; Sang, N. Tebuconazole induces liver injury coupled with ROS-mediated hepatic metabolism disorder. Ecotoxicology Environmental Safety. 2021,220, 112309. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112309
84. Kabakci, R.; Kaya, A.; Yigit, A. A.; Varisli, O. Assessment of tebuconazole exposure on bovine testicular cells and epididymal spermatozoa. Acta Veterinaria Hungarica. 2021, 69,2, 180–188. https://doi.org/10.1556/004.2021.00023.
85. Liu, N.; Dong, F.; Xu, J.; Liu, X.; Zheng, Y. Chiral bioaccumulation behavior of tebuconazole in the zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology Environmental Safety. 2016, ,126,78–84. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.007
86. Perez-Rodriguez, V.; Souders, C. L.; 2nd, Tischuk, C.; Martyniuk, C. J. Tebuconazole reduces basal oxidative respiration and promotes anxiolytic responses and hypoactivity in early-staged zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry Physiology C Toxicology. 2019,217, 87–97. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.017.
87. Poulsen, R.; Luong, X.; Hansen, M.; Styrishave, B.; & Hayes, T. Tebuconazole disrupts steroidogenesis in Xenopus laevis.Aquatic Toxicology. 2015,168,28–37. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.008
88. Petricca, S.; Flati, V.; Celenza, G.; Di Gregorio, J.; Lizzi, A. R.; Luzi, C.; Cristiano, L.; Cinque, B.; Rossi, G.; Festuccia, C.; & Iorio, R. Tebuconazole and Econazole Act Synergistically in Mediating Mitochondrial Stress, Energy Imbalance, and Sequential Activation of Autophagy and Apoptosis in Mouse Sertoli TM4 Cells: Possible Role of AMPK/ULK1 Axis. Toxicological Sciences.2019,169,1,209-223. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz031
89. Šiviková, K.; Dianovský, J.; Holečková, B.; Galdíková, M.; Kolesárová, V. Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole.Chemosphere.2013,92,5, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.00.
90. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ipconazole. EFSA Journal 2013, 11,4, 3181.
91. Saishoji, T.; Ito, A.; Kumazawa, S.; Chuman, H. Structure-activity relationships of enantiomers of the azole fungicide ipconazole and its related compounds: Fungicidal and

plant growth inhibitory activities.Journal Pesticide Sci. 1998,23, 129–136. https://doi10.1584/jpestics.22.119

92. European Food Safety Authority (EFSA). Statement concerning the review of the approval of the active substance ipconazole. EFSA J. 2022, 20(8), e07133.
93. Penagos-Tabares, F.; Sulyok, M.; Faas, J.; Krska, R.; Khiaosa-Ard, R.; Zebeli, Q. Residues of pesticides and veterinary drugs in diets of dairy cattle from conventional and organic farms in Austria. Environmental Pollution.2023,316,120626. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120626
94. Lee, G.; Banik, A.; Eum, J.; Hwang, B.J.; Kwon, S.H.; Kee, Y. Ipconazole Disrupts Mitochondrial Homeostasis and Alters GABAergic Neuronal Development in Zebrafish. International Journal of Molecular Sciences.2022,24,1,496. https://doi.org/10.3390/ijms24010496
95. Ruiz-Yance, I.; Siguas, J.; Bardales, B.; Robles-Castañeda, I.; Cordova, K.; Ypushima, A.; Estela-Villar, E.; Quintana-Criollo, C.; Estacio, D.; Rodríguez, J.-L. Potential Involvement of Oxidative Stress, Apoptosis and Proinflammation in Ipconazole-Induced Cytotoxicity in Human Endothelial-like Cells. Toxics. 2023,11,839. https://doi.org/10.3390/toxics11100839
96. Part A. CLH report Proposal for Harmonised Classification and Labelling Substance Name : Styrene CAS Number : 2011;2008,1272,1–77.
97. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017, 8416763. https://doi.org/10.1155/2017/8416763
98. Sato H., Shibata H., Shimizu T., Shibata S., Toriumi H., Ebine T. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. Neuroscience. 2013;248:345–358. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.010
99. Navarro-Yepes J., Zavala-Flores L., Anandhan A., Wang F., Skotak M., Chandra N. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. Pharmacology & Therapeutics. 2014;142:206–230. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.007

100. Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E. N., Lakshminarasaiah U. Antioxidants and human diseases. Clinica Chimica Acta. 2014;436:332–347. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004.
101. Wu J. Q., Kosten T. R., Zhang X. Y. Free radicals, antioxidant defense system, and schizophrenia. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 2013;46:200–206. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015
102. Taniyama Y., Griendling K. K. Reactive oxygen species in the vasculature. Hypertension. 2003 (42), 1075–1081.https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F
103. Al-Gubory K. H., Garrel C., Faure P., Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. Reproductive Biomedicine Online. 2012 ; 25 : 551–560. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.08.004
104. Hansen J. M., Go Y. M., Jones D. P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2006,46, 215–234. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141122
105. Glasauer A., Chandel N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. Biochemical Pharmacology. 2014,92,90–101. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.017
106. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione-dependent enzymes. Biochimica et Biophysica Acta.2012,1830,3217–3266 https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
107. Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.2007,39,44–84. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001
108. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews. 2002(82),47–95. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001.
109. Willcox J. K., Ash S. L., Catignani G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2004,44,275–295. https://doi.org/10.1080/10408690490468489.
110. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiological Reviews. 2007,87,315–424.https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006 .

111. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Cellular Signalling. 2007,19,1807–1819. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009.
112. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transactions. 2007;35:1147–1150. https://doi.org/10.1042/BST0351147.
113. Young I., Woodside J. Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology. 2001;54:176–186. https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176.
114. Frei B. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins. Oregon State University: Linus Pauling Institute; 1997. https://doi.org/10.1016/0002-9343(94)90292-5.
115. Nishida N., Arizumi T., Takita M., et al. Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. Digestive Diseases.2013;31,5-6:459–466. https://doi.org/10.1159/000355245
116. Yasui M., Kanemaru Y., Kamoshita N., Suzuki T., Arakawa T., Honma M. Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. DNA Repair (Amst) 2014;15:11–20.https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.01.003.
117. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis K., Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. International Journal of Environmental Research and Public Health.2013;10(9):3886–3907. https://doi.org/10.3390/ijerph10093886
118. Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., Setzer, W. N., Sharifi-Rad, J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. Frontiers in physiology, 2020,11, 694. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694
119. Zakeri ZF, Ahuja HS.Cell death/apoptosis: normal,chemically induced, and teratogenic effect.Mutation Research.1997,396(1):149–61.https://doi.org/10.1016/S0027-5107,97

120. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R,Mak TW, Lowe SW.Apaf-1 and caspasa-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. Science.1999,284,5411, 156–59.https://doi.org/10.1126/science.284.5411.156
121. Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-DiazS, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a mole-cular switch mechanism. Immunity.2013,39,3,443–453. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.018
122. Budillon A, Carbone C, Di Gennaro E.Tissuetransglutaminase: a new target to reverse cancer drugresistance.Amino Acids;2013,44,1,63–72. https://doi.org/10.1007/s00726-011-1167-9
123. Elmore S.Apoptosis: a review of programmed cell death.Toxicol Pathol;2007, 35,4,495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337
124. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J.Granzyme A inducescaspasa-independent mitochondrial damage, a requiredfirststep for apoptosis. Immunity;2005,22,3,355–70. https://doi.org/10.1016/j.immuni;2005.02.004
125. Lockshin RA, Zakeri Z.Apoptosis, autophagy, and more. International Journal of Biocemistry & Cell Biology;2004,36,12,2405–19. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.011
126. Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS (2014) Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeuticpotential.Nature Reviews Immunology;2014,14,3,166–80. https://doi.org/10.1038/nri3607
127. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A,Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K.Monocyte chemotactic and activating factor geneexpression induced in endothelial cells by IL-1 and tumornecrosis factor. The Journal of Immunology.1990,144,8,3034–3038.
128. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY,Rakic P.Programmed cell death of developingmammalian neurons after genetic deletion of caspasas. The Journal of Neuroscience 2001,21,13,4752–60. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-13-04752.2001

129. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells:implications in health and disease. The Journal of cell biology;2010,189,7,1059–70. https://doi.org/10.1083/jcb.201004096
130. Dickson DW.Apoptotic mechanisms in Alzheimerneurofibrillary degeneration: cause or effect?.The journal Clinical Investigation;2024,114,1,23–7. https://doi.org/10.1172/JCI22317
131. Punt, J.; Stranford, S.A.; Jones, P.P.; Owen, J.A. Innate Immunity. Kuby Immunology; WH Freeman: New York, NY, USA, 2019; pp. 120-132. ISBN 9781319172985
132. Sharma, B.R.; Kanneganti, T.-D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases.Nature Immunology;2021(22),550-559.https://doi.org/10.1038/s41590-021-00886-5
133. Fusco, R.; Siracusa, R.; Genovese, T.; Cuzzocrea, S.; Di Paola, R. Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome in Diseases. International Journal of Molecular Sciences;2020,21, 4223.https://doi.org/10.3390/ijms21124223
134. Kelley, N.; Jeltema, D.; Duan, Y.; He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. International Journal Molecular Sciences ; 2019; 20, 3328. https://doi.org/10.3390/ijms20133328
135. Sharma, D.; Kanneganti, T.-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. Journal of Cell Biology; 2016; 213, pp. 617-629. https://doi.org/10.1083/jcb.201602089
136. Sun, Q.; Scott, M.J. Caspasa-1 as a multifunctional inflammatory mediator: Noncytokine maturation roles. Journal Leukocyte Biology; 2016; 100, pp. 961-967. https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0516-224R
137. Tomasik, J.; Basak, G.W. Inflammasomes-New Contributors to Blood Diseases. International Journal Molecular Sciences;2022, 23, 8129. https://doi.org/10.3390/ijms23158129
138. Urwanisch, L.; Luciano, M.; Horejs-Hoeck, J. The NLRP3 Inflammasome and Its Role in the Pathogenicity of Leukemia. International Journal Molecular Sciences, 2021,22,1271. https://doi.org/10.3390/ijms22031271.

139. Chakraborty, S.; Shapiro, L.C.; de Oliveira, S.; Rivera-Pena, B.; Verma, A.; Shastri, A. Therapeutic targeting of the inflammasome in myeloid malignancies. Blood Cancer J.; 2021;11, 152. https://doi.org/10.1038/s41408-021-00547-8

140. Pretre, V.; Papadopoulos, D.; Regard, J.; Pelletier, M.; Woo, J. Interleukin-1 (IL-1) and the inflammasome in cancer. Cytokine; 2022; 153, 155850. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155850

141. Garlanda, C.; Dinarello, C.A.; Mantovani, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. Immunity; 2013; 39, 1003-1018. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010.

142. Ratajczak, M.Z.; Kucia, M. The Nlrp3 inflammasome-The evolving story of its positive and negative effects on hematopoiesis. Curr Opin Hematol;2021,28,251-261. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000658

143. Ward, G.A.; McGraw, K.L.; Abbas-Aghababazadeh, F.; Meyer, B.S.; McLemore, A.F.; Vincelette, N.D.; Lam, N.B.; Aldrich, A.L.; Al Ali, N.H.; Padron, E. et al. Oxidized mitochondrial DNA released after inflammasome activation is a disease biomarker for myelodysplastic syndromes. Blood Adv.; 2021; 5, 2216-2228. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003475.

144. Kucia, M.; Ratajczak, J.; Bujko, K.; Adamiak, M.; Ciechanowicz, A.; Chumak, V.; Brzezniakiewicz-Janus, K.; Ratajczak, M.Z. An evidence that SARS-CoV-2/COVID-19 spike protein (SP) damages hematopoietic stem/progenitor cells in the mechanism of pyroptosis in Nlrp3 inflammasome-dependent manner. Leukemia; 2021; 35, 3026-3029. https://doi.org/10.1038/s41375-021-01332-z

145. Knebel, C.; Heise, T.; Zanger, U.M.; Lampen, A.; Marx-Stoelting, P.; Braeuning, A. The azole fungicide tebu-conazole affects human CYP1A1 and CYP1A2 expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent pathway. Food and chemical toxicology: an international. Journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2019, 123, 481–491. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.039

146. Hamdi, H.; Graiet, I.; Abid-Essefi, S.; Eyer, J. Epoxiconazole profoundly alters rat brain and properties of neural stem cells. Chemosphere. 2022, 288. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132640

147. Hamdi, H.; Abid-Essefi, S.; Eyer, J. Cytotoxic and genotoxic effects of epoxiconazole on F98 glioma cells. Chemosphere. 2019, 229, 314–323. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.018
148. Schwarzbacherová, V.; Wnuk, M.; Lewinska, A.; Potocki, L.; Zebrowski, J.; Koziorowski, M.; Holečková, B.; Šiviková, K.; Dianovský, J. Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango® Super in bovine lymphocytes. Environmental pollution. 2017, 1987, 220, 255–263. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.057
149. Sanchez, C.L.; Souders, C.L.; Pena-Delgado, C.J.; Nguyen, K.T.; Kroyter, N.; Ahmadie, N.E.; Aristiza-bal-Henao, J.J.; Bowden, J. A., Martyniuk, C.J. Neurotoxicity assessment of triazole fungicides on mitochon-drial oxidative respiration and lipids in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Neurotoxicology.2020,80,76–86. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.06.009
150. Chen, P.J.; Moore, T.; Nesnow, S. Cytotoxic effects of propiconazole and its metabolites in mouse and human hepatoma cells and primary mouse hepatocytes. Toxicology *in vitro*: an international. Journal published in association with BIBRA. 2008,22,6, 1476 –1483. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.05.001
151. Theunissen, P.T.; Robinson, J.F.; Pennings, J.L.; De Jong, E.; Claessen, S.M.; Kleinjans, J.C.; Piersma, A.H. Transcriptomic concentration-response evaluation of valproic acid, cyproconazole, and hexaconazole in the neural embryonic stem cell test (ESTn). Toxicological sciences. An official journal of the Society of Toxicol-ogy. 2012,125,2, 430–438. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr293
152. Rigoulet, M.; Yoboue, E.D.; Devin, A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms in-volved in H_2O_2 signaling. Antioxidants & redox signaling. 2011,14,3, 459–468. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3363
153. Kovac, S.; Angelova, P.R.; Holmström, K.M.; Zhang, Y.; Dinkova-Kostova, A.T.; Abramov, A.Y. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. Biochim BiophysActa.2015(1850)4,794-801. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.021

154. Fridovich, I. Superoxide anion radical (O2-.), superoxide dismutases, and related matters. The Journal of Biological Chemistry;1997,272,30,18515–18517. https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515.
155. Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; & Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. The Journal of Cell biology,2018, 217,6, 1915–1928. https://doi.org/10.1083/jcb.201708007
156. Hamdi, H.; Rjiba-Touati, K.; Ayed-Boussema, I.; M'nassri, A.; Chaabani, H.; Rich, S.; Abid-Essefi, S. Epoxi-conazole caused oxidative stress related DNA damage and apoptosis in PC12 rat Pheochromocytoma. Neurotoxicology;2022,89,184–190. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.02.003
157. Hamdi, H.; Abid-Essefi, S.; Eyer, J. Neuroprotective effects of Myricetin on Epoxiconazole-induced toxicity in F98 cells. Free radical biology & medicine;2021,164,154–163. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.451
158. Hamdi, H.; Ben Salem, I.; Ben Othmène, Y.; Annabi, E.; Abid-Essefi, S. The involvement of ROS generation on Epoxiconazole-induced toxicity in HCT116 cells.Pesticide biochemistr physiology;2018,148,62–67. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.014
159. Jiang, X.; Wang, J.; Liu, J.; Zhu, H.; Hu, J.; Sun, X.; Zhou, W. Resveratrol ameliorates penconazole-induced cardiotoxicity by inhibition of oxidative stress and apoptosis in zebrafish larvae. Ecotoxicology and environ-mental safety;2023, 256, 114865. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114865
160. Ben Othmène, Y.; Monceaux, K.; Belhadef, A.; Karoui, A.; Ben Salem, I.; Boussabbeh, M.; Abid-Essefi, S.; Le-maire, C. Triazole fungicide tebuconazole induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. Environmental toxicology and pharmacology;2022, 94, 103919. https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103919
161. Nesnow, S.; Grindstaff, R.D.; Lambert, G.; Padgett, W.T.; Bruno, M.; Ge, Y.; Chen, P.J.; Wood, C.E.; Murphy, L. Propiconazole increases reactive oxygen species levels in mouse hepatic cells in culture and in mouse liv-er by a cytochrome P450 enzyme mediated process. Chemico-biological interactions. 2011, 194, 1, 79–89. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.08.002
162. Roelofs, M.J.E.; Temming, A.R.; Piersma, A.H.; Van den Berg, M.; Van Duursen, M.B.M. Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen

receptor activation in vitro. Toxicology reports. 2014, 1, 271–283. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.006

163. Othmène, Y.B.; Salem, I.B.; Hamdi, H.; Annabi, E.; Abid-Essefi, S. Tebuconazole induced cytotoxic and geno-toxic effects in HCT116 cells through ROS generation. Pesticide biochemistry and physiology. 2021, 174, 104797. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104797

164. Mesnage, R.; Defarge, N.; Spiroux de Vendômois, J.; Séralini, G.E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. Biomed Res Int. 2014, 179691. https://doi: 10.1155/2014/179691.

165. Ben Othmène, Y.; Hamdi, H.; Annabi, E.; Amara, I.; Ben Salem, I.; Neffati, F.; Najjar, M.F.; Abid-Essefi, S. Tebuconazole induced cardiotoxicity in male adult rat. Food Chem. Toxicol. 2020, 137, 111134. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111134

166. Lee, W.Y.; Lee, R.; Park, H.J. Tebuconazole Induces ER-Stress-Mediated Cell Death in Bovine Mammary Epithelial Cell Lines. Toxics;2023(11)4,397. https://doi.org/10.3390/toxics11040397

167. Ben, O.Y.; Ben, S.I.; Hamdi, H.; Annabi, E.; Abid-Essefi, S. Tebuconazole induced cytotoxic and genotoxic ef-fects in HCT116 cells through ROS generation. Pestic Biochem Physiol. 2021, 174, 104797. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104797

168. Othmène, Y. B.; Hamdi, H.; Salem, I. B.; Annabi, E.; Amara, I.; Neffati, F.; Najjar, M. F.; Abid-Essefi, S. Oxida-tive stress, DNA damage and apoptosis induced by tebuconazole in the kidney of male Wistar rat. Chem Biol Interact. 2020, 330, 109114. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109114

169. Kumar, N.; Awoyemi, O.; Willis, A.; Schmitt, C.; Ramalingam, L.; Moustaid-Moussa, N.; Crago, J. Compara-tive Lipid Peroxidation and Apoptosis in Embryo-Larval Zebrafish Exposed to 3 Azole Fungicides, Tebu-conazole, Propiconazole, and Myclobutanil, at Environmentally Relevant Concentrations. Environ Toxicol Chem. 2019,38,7, 1455–1466. https://doi.org/10.1002/etc.4429

170. Morgan, A. M.; Hassanen, E. I.; Ogaly, H. A.; Al Dulmani, S. A.; Al-Zahrani, F. A. M.; Galal, M. K.; Kamel, S.; Rashad, M. M.; Ibrahim, M. A.; Hussien, A. M. The ameliorative effect of N-acetylcysteine against pen-conazole induced neurodegenerative and

neuroinflammatory disorders in rats. J. Bioch. Mol. Toxicol. 2021, 35,10, e22884. https://doi.org/10.1002/jbt.22884

171. Zhu, B.; Liu, L.; Gong, Y. X.; Ling, F.; Wang, G. X. Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (Go-biocypris rarus) embryos. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2014, 21,23, 13625–13635. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3317-6
172. Ma, F.; Li, Y.; Yu, Y.; Li, Z.; Lin, L.; Chen, Q.; Xu, Q.; Pan, P.; Wang, Y.; Ge, R. S. Gestational exposure to tebu-conazole affects the development of rat fetal Leydig cells. Chemosphere. 2021,262,127792. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127792
173. Zhao, F.; Cao, F.; Li, H.; Teng, M.; Liang, Y.; Qiu, L. The effects of a short-term exposure to propiconazole in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2020, 27,30, 38212–38220. https://doi.org/10.1007/s11356-020-09968-7.
174. Guo, H.; Callaway, J. B.; Ting, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat. Med. 2015, 21,7, 677–687. https://doi.org/10.1038/nm.3893
175. Dumas, A.; Amiable, N.; de Rivero Vaccari, J. P.; Chae, J. J.; Keane, R. W.; Lacroix, S.; Vallières, L. The in-flammasome pyrin contributes to pertussis toxin-induced IL-1β synthesis, neutrophil intravascular crawl-ing and autoimmune encephalomyelitis. PLoS pathogens. 2014, 10,5, e1004150. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004150.
176. Wen, H.; Gris, D.; Lei, Y.; Jha, S.; Zhang, L.; Huang, M. T.; Brickey, W. J.; Ting, J. P. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat. Immunol. 2011, 12,5, 408–415. https://doi.org/10.1038/ni.2022
177. Zhang, L.; Ai, C.; Bai, M.; Niu, J.; Zhang, Z. NLRP3 Inflammasome/Pyroptosis: A Key Driving Force in Dia-betic Cardiomyopathy. Internationa Journal Molecular Sciences; 2022, 23, 10632. https://doi.org/10.3390/ijms231810632.
178. Zhang, M.; He, Q.; Chen, G.; Li, P.A. Suppression of NLRP3 Inflammasome, Pyroptosis, and Cell Death by NIM811 in Rotenone-Exposed Cells as an in vitro Model of Parkinson's Disease. Neurodegener Dis. 2020, 20, 2-3, 73–83. https://doi.org/10.1159/000511207
179. Won, J.H.; Park, S.; Hong, S.; Son, S.; Yu, J.W. Rotenone-induced Impairment of Mitochondrial Electron Transport Chain Confers a Selective Priming Signal for NLRP3 Inflammasome Activation. Journal Biological Chemistry. 2015,290,45, 27425–27437. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.667063

180. Liu, Z.; Zhao, H.; Liu, W.; Li, T.; Wang, Y.; Zhao, M. NLRP3 inflammasome activation is essential for para-quat-induced acute lung injury. Inflammation. 2015,38,1, 433–444. https://doi.org/10.1007/s10753-014-0048-2

181. Jang, Y.; Lee, A.Y.; Jeong, S.H.; Park, K.H.; Paik, M.K.; Cho, N.J.; Kim, J.E.; Cho, M.H. Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. Toxicology. 2015,338,37–46. https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.09.006